



Gabriela Cabrita Pereira

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

**Preparação e caracterização de nanopartículas
magnéticas como agentes de contraste para
imagem por ressonância magnética**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Presidente: Prof. Doutora Carla Quintão, DF – FCT-UNL
Arguente: Prof. Doutora Maria Manuel Marques, DQ – FCT-UNL
Orientador: Doutora Paula Isabel Pereira Soares, DCM – FCT/UNL
Co-orientador: Doutora Marta Cristina Parracho Cançado Corvo, DCM -
FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016

Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética

Copyright © Gabriela Cabrita Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm."

Winston Churchill

Aos meus pais e à minha irmã!

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Dr. Paula Soares, pela disponibilidade demonstrada ao longo de todo o período da dissertação. Por ter estado sempre presente e por ter sempre uma palavra de incentivo, mesmo quando os resultados não eram os mais promissores. Agradeço-lhe ainda o facto de ter proporcionado um ambiente de trabalho descontraído – sem nunca esquecer as responsabilidades –, a liberdade gradual – mas com uma constante atenção – e por todos os conhecimentos e conselhos transmitidos e partilhados.

À minha co-orientadora, Dr. Marta Corvo, agradeço-lhe por ter facilitado, com a sua boa disposição e forma de ser, a minha integração no laboratório de RMN; por toda a paciência; por todas as horas despendidas a tentar solucionar os problemas que se iam cruzando e por toda a persistência e curiosidade contagiante. Agradeço também pela constante preocupação e dedicação, característica sua.

Ao Professor Jorge Silva, o meu muito obrigada pela prontidão, paciência e amabilidade demonstradas aquando do meu repentino pedido para realizar ensaios de citotoxicidade às nanopartículas.

Ao Pedro Almeida, agradeço por toda a simpatia, ajuda e boa disposição, a si inerentes, a qual muito contribuiu para um ótimo ambiente de trabalho.

Aos meus colegas, e agora amigos, de laboratório – Jaime, Inês, Mariana e Ana – o meu muito obrigada por toda a ajuda e apoio incondicional demonstrados ao longo dos últimos seis meses. Foram, cada um à sua maneira, imprescindíveis neste capítulo que agora me vejo completar. Foi um prazer partilhá-lo com vocês!

Não posso também deixar de agradecer à D. Augusta, por todas as conversas e gargalhadas compartilhadas.

Aos meus três pilares – mãe, pai e irmã –, obrigada pelo apoio incontestável; por toda a força; por terem estado sempre presentes, mesmo quando não estavam ao meu lado; por me proporcionarem chegar tão longe; por me fazerem acreditar que irei muito mais além; pelos valores que sempre me transmitiram; por serem o meu exemplo; pela inquestionável motivação... Enfim, a lista é infinita. A vocês, o mais sincero de todos os obrigados!

Um obrigada do fundo do coração à Alice e ao João, os quais considero uns segundos pais, por todo o apoio e carinho com que sempre me trataram!

Não posso deixar de agradecer aos amigos que a FCT uniu, mas que o mundo jamais irá separar. Leo, Sara, Rita, Mafalda, Mimi, Pipas, Monteiro e Neto, obrigada pela vossa amizade e apoio. Se sou tão feliz, é por ter pessoas como vocês ao meu lado que o devo. Levo-vos no coração!

E por fim, mas não menos importante, aos amigos de sempre e para sempre – Becas, Inês, Júlio, Joana e Ferraz – o meu muito obrigada!

Resumo

A técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) apresenta elevada resolução espacial, mas baixa sensibilidade sendo, muitas vezes, necessário recorrer-se ao uso de agentes de contraste (AC).

Recentemente, tem surgido um interesse crescente no uso de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas para este propósito, devido às suas reduzidas dimensões, elevada razão área de superfície/volume, elevada magnetização e menor toxicidade em relação a outros AC, como o gadolínio. Contudo, estas tendem a agregar em solução aquosa, impedindo a sua aplicação em condições fisiológicas, requerendo o uso de tensioativos biocompatíveis, os quais podem alterar as características das nanopartículas e, consequentemente, a sua eficácia como agentes de contraste em IRM.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito de diferentes concentrações de ácido oleico (AO) – 64%, 96%, 128% e 192% – no revestimento de nanopartículas de óxido de ferro nos tempos de relaxação da água, bem como aferir o seu efeito no contraste em IRM.

A estabilidade das nanopartículas, sintetizadas por precipitação química, foi comprovada por DLS e potencial zeta, enquanto as análises de FTIR e de TGA mostram a sua ligação ao AO. Os resultados de TEM mostram que a concentração do revestimento não influencia o tamanho do diâmetro do núcleo das nanopartículas, o qual ronda os 10 nm. O padrão de DRX reflete a presença de uma estrutura cristalina de magnetite em todas as nanopartículas.

O efeito destas nos tempos de relaxação da água foi maioritariamente ao nível da relaxação transversal, pelo que as mesmas produziram um contraste negativo nas imagens adquiridas. Foram ainda realizados ensaios de citotoxicidade em fibroblastos para diferentes concentrações de ferro, mostrando que existe um compromisso com a quantidade de ácido oleico usada.

De entre as nanopartículas estudadas, as revestidas com 128% de ácido oleico surgem como as mais promissoras como AC para IRM.

Palavras-chave: Ácido Oleico, Imagem por Ressonância Magnética, Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas, Relaxometria por Ressonância Magnética Nuclear.

Abstract

The magnetic resonance imaging (MRI) technique has a high spatial resolution but low sensitivity, thus making the usage of contrast agents (CA) often necessary.

The application of superparamagnetic iron oxide nanoparticle as a CA has been a growing trend, due to its small size, high ratio of surface/volume, high magnetization and lower toxicity when compared with other CA's, such as gadolinium. However, these nanoparticles tend to aggregate in aqueous solutions, hindering their application in physiological conditions, and requiring the use of biocompatible surfactants, which can alter the nanoparticles features, changing its efficiency as CA in MRI.

The main objective of this work was to study the effects of different concentrations of oleic acid (OA) – 64%, 96%, 128% e 192% – on the coating of the iron oxide nanoparticles in the relaxation time of water, as well as inquiry its contrast effects in MRI.

The nanoparticles were synthesized by chemical precipitation, and its stability was proved by DLS and zeta potential, while the FTIR and TGA analysis showed its linkage to OA. The TEM findings showed that the concentration of coating does not alter the size of the nanoparticles core, which is about 10 nm. The pattern of DRX reflected the presence of a crystalline structure of magnetite in all nanoparticles.

The effect of the nanoparticles in the relaxation time of water was mainly at the level of transverse relaxation, as they produced a negative contrast in the acquired images. Cytotoxic essays were performed on fibroblast cells at different concentrations of iron, showing that there is a compromise with the quantity of oleic acid.

Out of the studied nanoparticles, the ones that were coated with 128% oleic acid were the ones that showed the biggest potential as contrast agents for MRI.

Keywords: Magnetic Resonance Imaging, Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry, Oleic Acid; Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

Índice

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE.....	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XXI
ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS	XXIII
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Ressonância Magnética Nuclear	3
2.1.1. Introdução ao fenómeno de RMN	3
2.1.2. Teoria da Relaxação	6
2.1.2.1. Relaxação longitudinal	7
2.1.2.1.1. Método da Inversão-Recuperação	8
2.1.2.2. Relaxação transversal	9
2.1.2.2.1. CPMG.....	10
2.1.3. Imagem por RMN	12
2.1.3.1. Agentes de contraste em IRM	13
2.1.3.1.1. Nanopartículas como agentes de contraste em IRM	15
2.2. Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas	15
2.2.1. Propriedades Magnéticas.....	16
2.2.2. Revestimento.....	18
2.2.2.1. Ácido Oleico	19
2.2.3. Técnicas de síntese	20
2.2.3.1. Precipitação química	20
3. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO.....	23
3.1. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro a 25°C.....	23
3.1.1. Materiais.....	23
3.1.2. Procedimento.....	23
3.2. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro a 80°C.....	24
3.3. Determinação da Concentração de Ferro	24
3.3.1. Materiais.....	24
3.3.2. Procedimento.....	25

3.4.	Caracterização	25
3.4.1.	Dispersão Dinâmica de luz e Potencial Zeta	26
3.4.2.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	26
3.4.3.	Análise Termogravimétrica	26
3.4.4.	Difração por Raios-X	26
3.4.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	27
3.5.	Análise e Discussão de Resultados	27
3.5.1.	Concentrações	27
3.5.2.	Dispersão Dinâmica de Luz e Potencial Zeta.....	28
3.5.2.1.	Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas Sintetizadas a 25°C	29
3.5.2.2.	Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas Sintetizadas a 80°C	32
3.5.2.3.	Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas revestidas com chAOT	33
3.5.3.	Potencial Zeta	36
3.5.4.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	39
3.5.5.	Análise Termogravimétrica	41
3.5.6.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	42
3.5.7.	Difração por Raios-X	44
4.	RELAXOMETRIA POR RMN, IRM E CITOTOXICIDADE.....	47
4.1.	Materiais e Métodos	47
4.1.1.	Relaxometria por RMN	47
4.1.2.	Imagem por RMN	47
4.1.3.	Citotoxicidade	48
4.1.3.1.	Procedimento.....	48
4.2.	Análise e Discussão de Resultados	49
4.2.1.	Relaxometria por RMN	49
4.2.2.	Imagem por RMN	56
4.2.3.	Citotoxicidade	58
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5.1.	Conclusões	61
5.2.	Sugestão de investigação futura	64
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Lista de Figuras

Fig. 2-1 Trajetória do momento magnético μ quando o átomo de hidrogénio é submetido a um campo magnético externo B_0 [18].	4
Fig. 2-2 Orientações segundo as quais os momentos magnéticos se podem alinhar em relação a B_0 , no caso do hidrogénio. Adaptado de [17].	4
Fig. 2-3 Magnetização total, segundo o eixo dos zz , de amplitude M_0 , e magnetização nula no plano xy [18].	5
Fig. 2-4 a) Magnetização total, M_0 , no equilíbrio quando os spins estão sob ação de um campo magnético externo, B_0 ; b) Um pulso de radiofrequência, induzido por um campo magnético perpendicular a B_0 , B_1 , move a magnetização para o plano xy ; c) A magnetização precessa sob o eixo dos zz e o sinal diminui de intensidade no eixo xy ; d) FID: o sinal recolhido é uma senoide amortecida; f) Espectro de RMN produzido através da transformada de <i>Fourier</i> . Adaptado de [19].	6
Fig. 2-5 Relaxação longitudinal. A recuperação do vetor da magnetização diminui a componente transversal e reestabelece a longitudinal [18].	7
Fig. 2-6 O processo de relaxação é aleatório e, consequentemente, a recuperação de M_z até M_0 é governada por uma função exponencial. T_1 representa o tempo necessário para a magnetização recuperar 63% do valor de M_0 [18].	7
Fig. 2-7 Método da Inversão-Recuperação. Um primeiro pulso de 180° inverte o sentido da magnetização total, enquanto que um segundo de 90° desloca a magnetização para o plano xy [18].	8
Fig. 2-8 À medida que dois prótons se aproximam, estes experienciam uma variação no campo magnético a que estão sujeitos, o qual altera a sua frequência de precessão [17].	9
Fig. 2-9 Relaxação Transversal. As mudanças no campo magnético local fazem com que os spins precessem com frequências ligeiramente diferentes, o que conduz ao desaparecimento da magnetização transversal. Adaptada de [18].	9
Fig. 2-10 Uma vez que as interações entre os spins são aleatórias, o vetor da magnetização transversal resultante decai exponencialmente. T_2 representa o tempo necessário para que a magnetização transversal decresça para 37% do seu valor inicial. Adaptada de [17].	10
Fig. 2-11 Diminuição da intensidade da magnetização a cada TE, de acordo com a constante de tempo T_2 [18].	11
Fig. 2-12 Efeito da sequência de CPMG na presença de imperfeições do pulso de RF. Estas fazem com que a medida de amplitude do ângulo aplicado não seja exatamente de 180° , o que faz com que os vetores fiquem acima (cinzento escuro) ou abaixo (cinzento claro) do plano xy ,	

o que reduz a intensidade dos ecos “ímpares”. Ao se repetir a sequência, os erros são cancelados pelas imperfeições do segundo pulso de 180° , pelo que os ecos “pares” são utilizados para calcular o tempo de relaxação transversal, T_2 [18].	12
Fig. 2-13 Vários tipos de ponderação em função dos tempos de repetição e de eco. (https://www.imaio.com/en/e-Courses/e-MRI/MRI-signal-contrast/Signal-weighting) ...	13
Fig. 2-14 Influência de r_2/r_1 na eficiência do agente de contraste. Nota: elevados valores de r_2/r_1 produzem um sinal hipotenso em imagens ponderadas em T_2 , fazendo com que os órgãos surjam escuros na imagem. Por outro lado, valores de r_2/r_1 pequenos fazem com que os órgãos surjam mais claros e brilhantes nas imagens [23].	14
Fig. 2-15 Estrutura da magnetite (os círculos a preto representam Fe^{2+} , os a verde Fe^{3+} e os a vermelho O^{2-}) [27].	16
Fig. 2-16 Esquema dos momentos magnéticos a) orientados aleatoriamente em materiais paramagnéticos; b) alinhados paralelamente em materiais ferromagnéticos; c) adjacentes de diferentes magnitudes alinhados antiparalelamente em materiais ferrimagnéticos.	17
Fig. 2-17 Estrutura química do ácido oleico (http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393217.html).	19
Fig. 3-1 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe_3O_4 AO 64%, para diferentes concentrações de ferro.	29
Fig. 3-2 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de a) NPs Fe_3O_4 AO 96%, b) NPs Fe_3O_4 AO 128% e c) Fe_3O_4 AO 192%, para diferentes concentrações de ferro.	30
Fig. 3-3 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe_3O_4 AO 64%, 96%, 128% e 192%, para uma mesma concentração de ferro.	31
Fig. 3-4 Funções de autocorrelação das NPs Fe_3O_4 AO 64% com a) adição imediata de ácido oleico e com b) adição após o processo de lavagem, sintetizadas a 80°C , para diferentes concentrações de ferro.	32
Fig. 3-5 Funções de autocorrelação das NPs Fe_3O_4 chAOT 100%, para diferentes concentrações de ferro.	34
Fig. 3-6 Funções de autocorrelação das NPs Fe_3O_4 chAOT 200%, para diferentes concentrações de ferro.	35
Fig. 3-7 Dupla camada elétrica que circunda a superfície das nanopartículas (imagem adaptada de [56]).	36
Fig. 3-8 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe_3O_4 AO 64% para uma concentração de ferro de 33,5 mM, a diferentes pH.	37

Fig. 3-9 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta em função do pH para NPs Fe_3O_4 AO 64%, para uma concentração de ferro de 33,5 mM.	38
Fig. 3-10 Espectro de FTIR do ácido oleico.	39
Fig. 3-11 Espectro de FTIR das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	39
Fig. 3-12 Curvas TGA (a) e DTA (b) das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	41
Fig. 3-13 Imagem obtida por TEM de NPs Fe_3O_4 AO 64% e respetivo gráfico de distribuição de tamanhos.	42
Fig. 3-14 Imagem obtida por TEM de NPs Fe_3O_4 AO 96% e respetivo gráfico de distribuição de tamanhos.	43
Fig. 3-15 Imagem obtida por TEM de NPs Fe_3O_4 AO 128% e respetivo gráfico de distribuição de tamanhos.	43
Fig. 3-16 Imagem obtida por TEM de NPs Fe_3O_4 AO 192% e respetivo gráfico de distribuição de tamanhos.	43
Fig. 3-17 Padrões de DRX das nanopartículas sintetizadas com diferentes concentrações de ácido oleico.	45
Fig. 3-18 Padrões de DRX das nanopartículas de Fe_3O_4 sem revestimento.	45
Fig. 4-1 Taxa de relaxação longitudinal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	49
Fig. 4-2 Taxa de relaxação transversal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	50
Fig. 4-3 Esquema ilustrativo do efeito da concentração de ácido oleico na aproximação das moléculas de água à superfície da nanopartícula. À esquerda direita, uma menor maior concentração de ácido oleico possibilita uma maior menor aproximação das moléculas de água à superfície da nanopartícula. a) Molécula de água; b) molécula de ácido oleico; c) nanopartícula revestida; d) bicamada de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala.	52
Fig. 4-4 Representação esquemática do efeito de uma vesícula na diminuição da interação entre as moléculas de água e a nanopartícula. Na figura à esquerda retrata-se uma possível situação para as nanopartículas Fe_3O_4 AO 64% e à direita para Fe_3O_4 AO 96%. a) Bicamada de ácido oleico; b) molécula de ácido oleico; c) nanopartícula revestida; d) molécula de água; e) micela de ácido oleico; f) vesícula de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala.	52
Fig. 4-5 Representação esquemática da influência da concentração de nanopartículas na agregação das mesmas, para uma concentração de ácido oleico constante. À esquerda direita, um maior menor concentração de nanopartículas conduz a uma maior menor	

agregação das mesmas. a) Molécula de água; b) nanopartículas e c) bicamada de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala.	53
Fig. 4-6 Representação esquemática da influência da interação entre as moléculas de água e as nanopartículas. À esquerda direita um maior menor estado de agregação conduz a uma menor maior interação. a) Molécula de água; b) bicamada de ácido oleico e c) nanopartículas. Nota: o esquema não está feito à escala.	54
Fig. 4-7 Esquema ilustrativo da interação das moléculas de água com as moléculas de ácido oleico quando as mesmas revestem um agregado de nanopartículas ou nanopartículas isoladamente. À esquerda direita, uma menor maior área de superfície de contacto conduz a uma menor maior interação com as moléculas de água. a) Molécula de água; b) bicamada de ácido oleico e c) nanopartículas. Nota: o esquema não está feito à escala.	54
Fig. 4-8 Sedimentação das NPs após 9 h sob a ação de um campo magnético.	56
Fig. 4-9 – Efeito no contraste da imagem de NPs Fe ₃ O ₄ AO 64% (a), NPs Fe ₃ O ₄ AO 96% (b), NPs Fe ₃ O ₄ AO 128% (c) e Fe ₃ O ₄ AO 192% (d) para diferentes concentrações de ferro....	57
Fig. 4-10 – Contraste da imagem das NPs Fe ₃ O ₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico, com uma concentração de ferro de 0,4 mM. A que apresenta menor contraste são as NPs Fe ₃ O ₄ AO 96% e a que apresenta maior são as NPs Fe ₃ O ₄ AO 128%.....	58
Fig. 4-11 Viabilidade celular de células Vero após 24 h de exposição aos quatro tipos de nanopartículas: NPs Fe ₃ O ₄ AO 64%, NPs Fe ₃ O ₄ AO 96%, NPs Fe ₃ O ₄ AO 128%, NPs Fe ₃ O ₄ AO 192%. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão para, pelo menos, três experiências independentes. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001 comparativamente às células controlo.	59

Lista de Tabelas

Tabela 3-1 Concentrações de ferro, nanopartículas e ácido oleico nas soluções iniciais das nanopartículas sintetizadas a 25°C.....	27
Tabela 3-2 Concentrações de ferro, nanopartículas e ácido oleico na solução inicial das nanopartículas sintetizadas a 80°C.....	28
Tabela 3-3 Concentrações de ferro, nanopartículas e chAOT nas soluções iniciais das nanopartículas sintetizadas a 25°C.....	28
Tabela 3-4 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e respectivos desvios padrões de NPs Fe ₃ O ₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	31
Tabela 3-5 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e respectivos desvios padrões das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com 64% de ácido oleico, sintetizadas a 80°C, com adição imediata de ácido oleico e após o processo de lavagem.	32
Tabela 3-6 Índices de polidispersão para as diversas concentrações de ferro analisadas por DLS, relativos às NPs Fe ₃ O ₄ chAOT 100%	35
Tabela 3-7 Índices de polidispersão para as diversas concentrações de ferro analisadas por DLS, relativos às NPs Fe ₃ O ₄ chAOT 200%	35
Tabela 3-8 Índice de polidispersão das soluções com pH 1,9; 2,9; 4,3; 10,5 e 11,9.....	37
Tabela 3-9 Índice de polidispersão das soluções com pH 6,6; 7,2; 7,4; 8,3 e 10,1.....	37
Tabela 3-10 Picos derivativos e perdas de massa das NPs Fe ₃ O ₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.....	41
Tabela 4-1 Relaxividade longitudinal e transversal das NPs Fe ₃ O ₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.	50
Tabela 4-2 Taxa de relaxação transversal das NPs Fe ₃ O ₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico para diferentes concentrações de ferro.	58

Acrónimos e Símbolos

AC	Agentes de contraste
AO	Ácido oleico
B_0	Campo magnético externo
B_1	Campo magnético perpendicular a B_0
chAOT	Diocil sulfosuccinato de colina
CP	<i>Carr–Purcell</i>
CPMG	<i>Carr–Purcell–Meiboom–Gill</i>
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DRX	Difração de raios-X
FAC	Função de autocorrelação
Fe_3O_4 AO	Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido oleico
Fe_3O_4 chAOT	Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com diocil sulfosuccinato de colina
FID	<i>Free induction decay</i>
FLASH	<i>Fast low angle shot</i>
FT	Transformada de <i>Fourier</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
IR	Inversão-recuperação
IRM	Imagem por ressonância magnética
LI	Líquido iônico
MSME	<i>Multislice-multiecho</i>
NPs	Nanopartículas
r_1	Relaxividade longitudinal
R_1	Taxa de relaxação longitudinal
r_2	Relaxividade transversal
R_2	Taxa de relaxação transversal
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância magnética nuclear
SPIONs	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal
T_2^*	Tempo de desfaseamento considerando as interações entre os spins dos prótons e heterogeneidades do campo magnético externo
TE	Tempo de eco

TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
TR	Tempo de repetição
μ	Momento magnético
Gd ³⁺	Ião de gadolínio
M ₀	Magnetização total
M _{xy}	Magnetização no plano transversal
M _z	Magnetização no plano longitudinal
ω_0	Frequência de <i>Larmor</i>



Contextualização

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma poderosa técnica de diagnóstico que permite o estudo de tecidos moles [1]. Esta baseia-se, essencialmente, na obtenção de imagens adquiridas através do sinal proveniente da relaxação dos prótons de moléculas móveis existentes no corpo humano, na maioria água, devido à sua abundância nos tecidos biológicos [2]. Contudo, o elevado tempo de relaxação dos referidos prótons nem sempre resulta em níveis de contraste que permitam uma nítida diferenciação dos tecidos em análise [3].

Neste sentido, é imperioso recorrer-se à utilização de agentes que, por diminuírem os tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água presente nos tecidos [2], aumentam o contraste da imagem, o que providencia uma melhor delineação entre o tecido saudável e o patológico, facilitando o diagnóstico do estado clínico [4].

Os quelatos de gadolínio representam um dos grupos de agentes de contraste mais utilizados em IRM. No entanto, a sua estrutura molecular limita o seu uso devido à sua rápida excreção através dos rins [3]. Além disso, descobertas recentes têm revelado respostas tóxicas ao Gd^{3+} , particularmente em pacientes com insuficiência renal [3].

Deste modo, com o intuito de minimizar alguns destes inconvenientes, e devido às suas propriedades, emergiu outro grande grupo de agentes de contraste passível de ser utilizado em IRM – o das nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) [4].

Tais partículas, por apresentarem reduzidas dimensões aliadas a uma elevada razão área de superfície/volume [3], elevada magnetização e boa biocompatibilidade [5], têm-se revelado promissores agentes de contraste em ressonância magnética nuclear (RMN).

No entanto, a falta de estabilidade coloidal nanopartículas de óxido de ferro (NPs Fe_3O_4) em ambientes fisiológicos impede a sua aplicação, fazendo com que seja crucial o revestimento das mesmas com agentes tensioativos biocompatíveis [6]. De entre os existentes, o ácido oleico (AO) é um dos mais utilizados para estabilizar as NPs Fe_3O_4 [7].

Apesar de existirem diversas referências na literatura à utilização de nanopartículas (NPs) revestidas com AO [8-11], são raros os estudos que focam a caracterização dos tempos de

relaxação dos prótons das moléculas de água aquando do contacto com as NPs [12, 13] e ainda mais os que apresentam imagens que retratem efetivamente o seu efeito como agentes de contraste (AC) [14, 15], imprescindíveis para averiguar e otimizar a sua possível utilização como AC.

Desta forma, a presente dissertação pretende testar a eficácia de NPs Fe_3O_4 revestidas com diferentes quantidades de AO – 64%, 96%, 128% e 192% relativamente à massa de nanopartículas de óxido de ferro – como AC em imagem por ressonância magnética, através de estudos de relaxometria e de imagem.

Neste contexto, o presente trabalho estrutura-se em cinco partes principais – a seguir a esta contextualização, apresenta-se o enquadramento teórico do estudo, o qual se foca, essencialmente, na técnica de imagem por ressonância magnética nuclear e no papel das NPs Fe_3O_4 na mesma.

No capítulo seguinte explicitam-se os materiais e métodos necessários à síntese das NPs e ao cálculo da concentração de ferro nelas presente, uma descrição dos equipamentos e parâmetros utilizados para a caracterização das NPs e, por fim, a análise e discussão dos resultados provenientes dessas caracterizações.

O capítulo subsequente é dedicado à relaxometria de RMN, à IRM e à citotoxicidade, no qual, à semelhança do anterior, se realiza uma descrição dos equipamentos, parâmetros e procedimentos utilizados e uma análise e discussão de resultados deles advindos.

A dissertação termina com um capítulo de considerações finais, o qual engloba as conclusões do estudo e sugestões de investigação futura.



Enquadramento Teórico

Neste capítulo abordam-se alguns conceitos inerentes à técnica de imagem por ressonância magnética nuclear, justificando-se a necessidade de introdução de agentes de contraste. De entre eles, dá-se particular relevância às nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas, relativamente às quais se fundamenta a necessidade da utilização de revestimentos – dando-se particular enfoque ao ácido oleico – e formas de síntese. Dado que estas nanopartículas constituem o principal foco da dissertação, serão abordadas num ponto independente.

2.1. Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de IRM tornou-se, na última década, a mais rigorosa, sofisticada e promissora forma de diagnóstico clínico. Tal facto deve-se, essencialmente, à excelente resolução espacial e ao contraste em tecidos moles [1] que as imagens por ela obtidas exibem e ao conforto e proteção geralmente proporcionados ao paciente, uma vez que é considerado um método não-invasivo e que não faz uso de radiação ionizante [16].

2.1.1. Introdução ao fenómeno de RMN

A técnica de IRM tem como base o fenómeno de ressonância magnética nuclear assente, como o próprio nome indica, no núcleo dos átomos [17], os quais podem ser caracterizados pelo seu número quântico de spin nuclear, I , o qual pode apresentar valores iguais ou superiores a zero, múltiplos de $\frac{1}{2}$ [18].

O núcleo do hidrogénio, devido à sua abundância no corpo humano, é de especial interesse nesta técnica, sendo constituído por uma única partícula carregada positivamente – protão – que, como todas as partículas fundamentais, possui um movimento de rotação ao longo do seu próprio eixo e, conseqüentemente, um campo magnético a si associado, conhecido como momento magnético, μ [17]. Quando o átomo de hidrogénio é submetido a um campo magnético externo, B_0 , este

momento segue uma trajetória circular em torno do mesmo, devido ao torque que este lhe impõe (Fig. 2-1) [18].

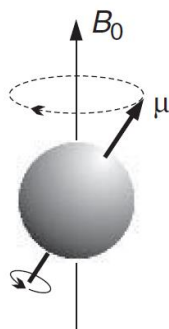


Fig. 2-1 Trajetória do momento magnético μ quando o átomo de hidrogénio é submetido a um campo magnético externo B_0 [18].

Este movimento, conhecido como *precessão de Larmor*, ocorre a uma frequência, ω_0 , que depende da natureza do núcleo e da força do campo magnético aplicado [19] ($\omega_0 = \gamma B_0$, onde γ representa a constante giromagnética que, no caso do hidrogénio, é de $2,7 \times 10^8 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$ [17]).

Para um determinado número quântico de spin nuclear, existem apenas $2I+1$ orientações segundo as quais os momentos magnéticos se podem alinhar em relação a B_0 . Como tal, no caso do hidrogénio, e uma vez que este apresenta $I=1/2$, existem somente duas possíveis orientações, paralela (ou α) e antiparalela (ou β) a B_0 (ver Fig. 2-2) [18].

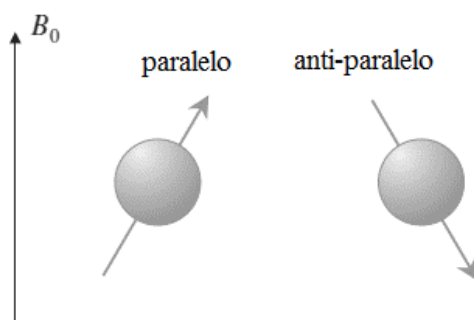


Fig. 2-2 Orientações segundo as quais os momentos magnéticos se podem alinhar em relação a B_0 , no caso do hidrogénio. Adaptado de [17].

De acordo com a equação de *Boltzmann*, existem mais prótons no estado paralelo do que no antiparalelo, uma vez que ao primeiro está associado um estado de menor energia. Desta forma, será produzida uma magnetização total, orientada, por convenção, segundo o eixo dos zz , e cuja amplitude é designada por M_0 (ver Fig. 2-3) [19]. Repare-se ainda que, como nada define uma

orientação preferencial no plano transversal (xy), existe uma distribuição aleatória dos momentos magnéticos segundo o mesmo e, consequentemente, a magnetização neste plano é nula [18].

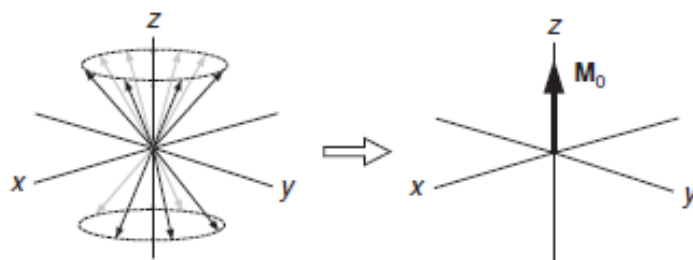


Fig. 2-3 Magnetização total, segundo o eixo dos zz , de amplitude M_0 , e magnetização nula no plano xy [18].

O fenómeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando o núcleo muda o seu estado de spin, devido à absorção de uma quantidade específica de energia:

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Eq. 2-1}$$

onde h representa a constante de *Plank* [18].

Tal energia é aplicada sob a forma de um pulso de radiofrequência (RF), o qual cria um campo magnético B_1 , perpendicular a B_0 , que oscila à frequência de *Larmor*, para que a condição de ressonância seja satisfeita [17].

Os pulsos de RF, de acordo com a sequência de imagem aplicada, deslocam M_0 segundo um determinado ângulo (*flip angle*), geralmente com uma medida de amplitude de 90° , originando uma magnetização no plano transversal, M_{xy} [4]. Estes pulsos têm também outro importante efeito nos spins dos átomos, uma vez que os coloca em coerência de fase, ou seja, todos eles apontam na mesma direção no círculo sobre o qual precessam [17].

Após a remoção do pulso de RF, os momentos magnéticos dos prótons relaxam e retornam ao equilíbrio [4]. Consequentemente, ao se colocar uma bobina recetora no plano xy , é induzida uma corrente elétrica na mesma e, após uma conversão analógica/digital, adquire-se um sinal de decaimento livre (do inglês *Free Induction Decay – FID*), o qual corresponde a uma frequência temporal. Através da transformada de *Fourier* (FT) do sinal, é possível obter-se um espectro de frequências contidas no mesmo (ver Fig. 2-4) [19].

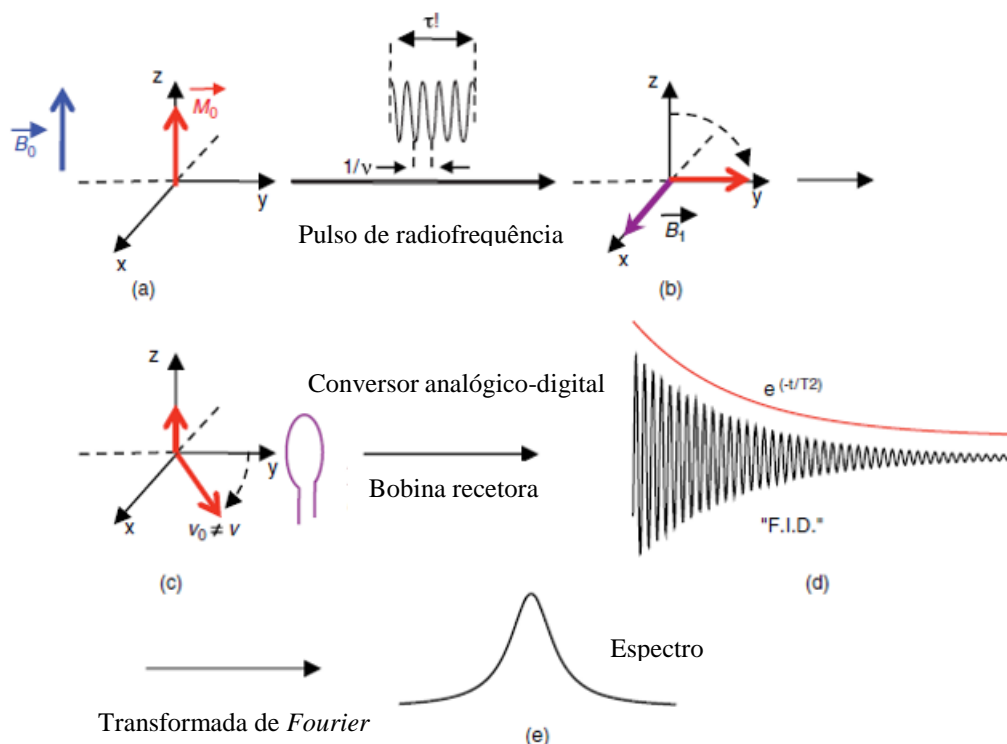


Fig. 2-4 a) Magnetização total, M_0 , no equilíbrio quando os spins estão sob ação de um campo magnético externo, B_0 ; b) Um pulso de radiofrequência, induzido por um campo magnético perpendicular a B_0 , B_1 , move a magnetização para o plano xy ; c) A magnetização precessa sob o eixo dos zz e o sinal diminui de intensidade no eixo xy ; d) FID: o sinal recolhido é uma senoide amortecida; f) Espectro de RMN produzido através da transformada de *Fourier*. Adaptado de [19].

2.1.2. Teoria da Relaxação

Tal como já foi referido, os pulsos de RF aplicados a uma amostra que se encontre em equilíbrio térmico perturbam o estado de repouso dos seus spins nucleares. Após esta perturbação, o sistema restabelece a sua condição de equilíbrio, libertando o excesso de energia que lhe foi transmitido pelo pulso de RF por um processo denominado relaxação nuclear [18], a qual pode ocorrer segundo dois mecanismos diferentes: relaxação transversal e relaxação longitudinal. Na relaxação longitudinal, a componente transversal da magnetização vai gradualmente desaparecendo, enquanto a longitudinal tende a retornar ao seu estado inicial [20] – ver Fig. 2-5. O tempo requerido para que tal fenómeno decorra é designado por tempo de relaxação e é específico de cada tecido [4].

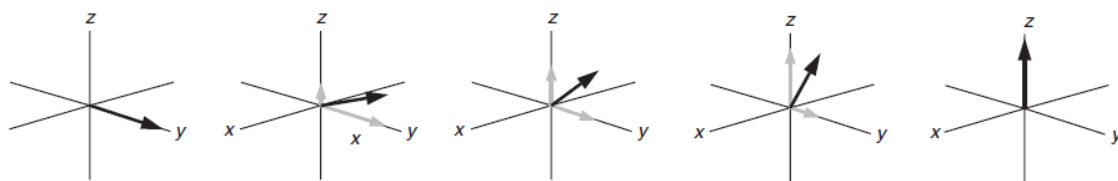


Fig. 2-5 Relaxação longitudinal. A recuperação do vetor da magnetização diminui a componente transversal e reestabelece a longitudinal [18].

2.1.2.1. Relaxação longitudinal

O fenómeno da relaxação longitudinal ocorre devido à interação entálpica existente entre os núcleos excitados e o seu ambiente, em particular com os agentes magnéticos nele ativos (prótons, eletrões desemparelhados, moléculas). Os movimentos dos momentos magnéticos destes criam uma distribuição de frequências, as quais podem coincidir com a frequência de ressonância dos núcleos excitados, pelo que uma relaxação estimulada dos mesmos pode ocorrer [19]. Assim, à medida que os prótons perdem a energia extra proveniente do pulso de RF, os que anteriormente foram induzidos a um estado de maior energia transitam para os estados de menor energia (estado fundamental) [20], pelo que, eventualmente, a magnetização ao longo dos eixos dos zz é totalmente recuperada, retornando ao valor de M_0 [17]. Uma vez que a energia é libertada para a vizinhança, também designada por rede (do inglês *lattice*), esta relaxação é comumente denominada por relaxação spin-rede (do inglês *spin-lattice-relaxation*) [20] e é caracterizada pelo tempo de relaxação T_1 . Este quantifica o tempo necessário à recuperação exponencial de 63% do valor inicial de M_0 , ao longo do eixo dos zz , após a aplicação de um pulso de RF [4] – ver Fig. 2-6.

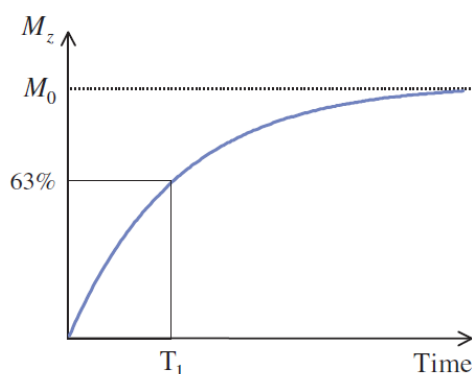


Fig. 2-6 O processo de relaxação é aleatório e a recuperação de M_z até M_0 é governada por uma função exponencial. T_1 representa o tempo necessário para a magnetização recuperar 63% do valor de M_0 [18].

Desta forma, e começando pela posição na qual a magnetização em z é nula, (por exemplo, imediatamente após a amostra ter sido submetida ao pulso de RF), a magnetização longitudinal no tempo t é dada por [18]:

$$M_z = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad \text{Eq. 2-2}$$

Existem diversas experiências que permitem a determinação dos tempos de relaxação longitudinal dos spins nucleares, sendo uma das mais utilizadas o método da inversão-recuperação (IR, do inglês *inversion-recovery*).

2.1.2.1.1. Método da Inversão-Recuperação

O método IR consiste numa sequência de dois pulsos, um primeiro de 180° e um segundo de 90° [18]. O pulso de 180° tem o objetivo de inverter o sentido da magnetização longitudinal, a qual inicialmente se encontra no sentido positivo do eixo dos zz . Findo este pulso, irá iniciar-se o processo de relaxação, no qual a magnetização longitudinal se move em direção ao eixo positivo dos zz , de forma a restabelecer o equilíbrio [19]. Uma vez que a magnetização longitudinal é inobservável, o pulso de 90° tem a função de deslocar a magnetização para o eixo xy , de forma que esta seja, então, mensurável. O tempo que decorre entre a aplicação do pulso de 180° e de 90° é denominado tempo de inversão τ [19] – ver Fig. 2-7.

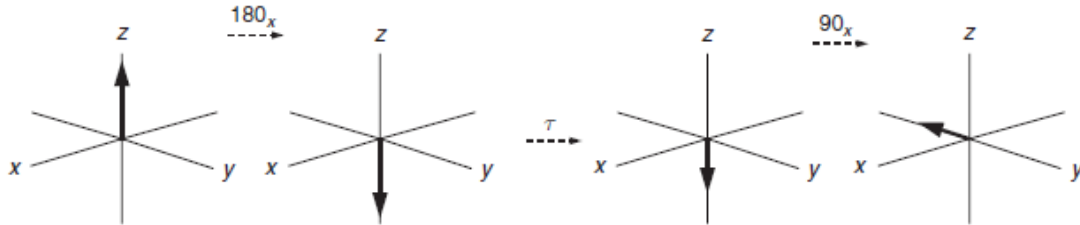


Fig. 2-7 Método da Inversão-Recuperação. Um primeiro pulso de 180° inverte o sentido da magnetização total, enquanto que um segundo de 90° desloca a magnetização para o plano xy [18].

A repetição desta experiência com o sucessivo aumento dos valores de τ permite o seguimento da relaxação dos spins em questão. A intensidade da magnetização é dada por:

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}}) \quad \text{Eq. 2-3}$$

na qual M_0 corresponde à magnetização no equilíbrio. Realce-se o fator de 2 em relação à Eq. 2-2, que surge como resultado da recuperação começar da magnetização invertida [18].

2.1.2.2. Relaxação transversal

No que respeita à relaxação transversal, esta ocorre devido à perda de coerência de fase experienciada pelos spins após o término do pulso de RF [19]. Tal perda advém de pequenas diferenças entre as frequências de precessão dos próprios spins criadas por heterogeneidades do campo. De facto, quando dois prótons se aproximam, o campo magnético a que estão sujeitos varia consoante o momento magnético do outro próton é somado ou subtraído ao campo principal B_0 [17] – ver Fig. 2-8.

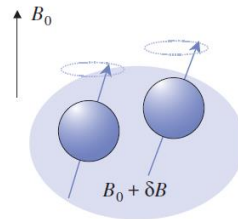


Fig. 2-8 À medida que dois prótons se aproximam, estes experienciam uma variação no campo magnético a que estão sujeitos, o qual altera a sua frequência de precessão [17].

Consequentemente, as frequências com que precessam irão alterar-se de forma a se adaptarem ao ‘novo’ campo magnético a que cada um está sujeito, sendo a essa frequência que desfasam. Quando, por outro lado, os prótons se voltam a afastar, ambos regressam à frequência de *Larmor* inicial, embora o desfasamento que adquiriram seja irreversível [17].

Como cada próton interage com milhares de outros prótons, o desfasamento criado irá ser cada vez maior, até que ficam completamente desfasados entre si – ver Fig. 2-9.

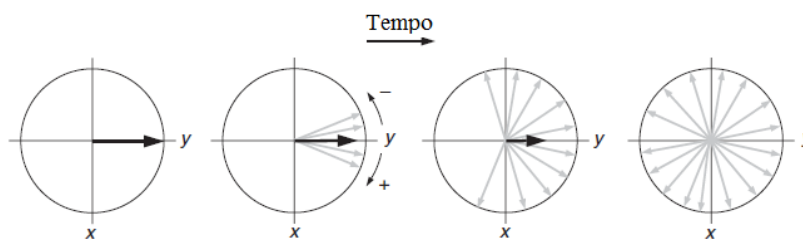


Fig. 2-9 Relaxação Transversal. As mudanças no campo magnético local fazem com que os spins precessem com frequências ligeiramente diferentes, o que conduz ao desaparecimento da magnetização transversal. Adaptada de [18].

Consequentemente, e uma vez que o movimento dos prótons é aleatório, o vetor soma dos momentos magnéticos no plano xy decai exponencialmente [17]:

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{\tau}{T_2}} \quad \text{Eq. 2-4}$$

Este processo de relaxação, à semelhança da relaxação longitudinal, é também caracterizado por uma constante de tempo, T_2 , a qual representa o tempo necessário para que a magnetização no plano transversal diminua para 37% do seu valor inicial, após a aplicação de um pulso de RF [4] – ver Fig. 2-10.

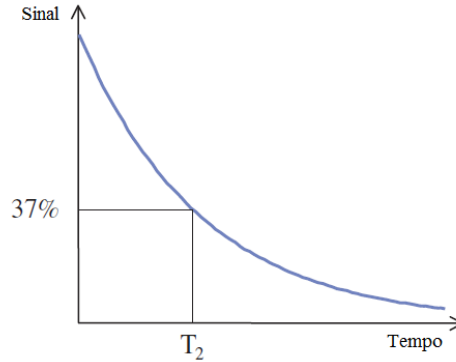


Fig. 2-10 Uma vez que as interações entre os spins são aleatórias, o vetor da magnetização transversal resultante decai exponencialmente. T_2 representa o tempo necessário para que a magnetização transversal decresça para 37% do seu valor inicial. Adaptada de [17].

O desfaseamento dos spins pode também advir da influência do próprio campo B_0 , o qual não é completamente uniforme [20]. Quando o tempo de desfaseamento tem em consideração ambos os fatores mencionados – interações entre os spins dos prótons e heterogeneidades do campo magnético externo – este é designado por T_2^* [3], o qual é dado por:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2(\Delta B_0)}} \quad \text{Eq. 2-5}$$

onde $T_{2(\Delta B_0)}$ é o tempo de relaxação provocado pelas heterogeneidades do campo externo.

Existem diversas sequências passíveis de serem utilizadas de forma a extrair o valor de T_2 , sendo o método de *Carr–Purcell–Meiboom–Gill* (CPMG) o mais usado.

2.1.2.2.1. CPMG

A sequência de *Carr e Purcell* (CP) consiste na aplicação de um pulso de 90° que move a magnetização para o plano xy , e vários pulsos de 180° , os quais invertem o sentido dos spins dos prótons neste mesmo plano, de forma a reconstituir a coerência de fase que os mesmos perdem após o primeiro pulso, provocada pelas heterogeneidades do campo. Devido a esta recuperação

de fase, é criado um eco, o qual atinge o seu máximo após um período de tempo TE – tempo que decorre entre a aplicação do pulso de 90° e o máximo do eco – igual a 2τ , sendo τ o intervalo de tempo entre a aplicação do pulso de 90° e 180° . Desta forma, o máximo de cada eco corresponde ao ponto de máxima coerência de fase dos prótons [21]. Contudo, durante o período de tempo 2τ , devido à relaxação transversal criada pela interação entre os spins, é perdida alguma coerência de fase, a qual não é recuperada. Tal significa que, a cada TE, a intensidade da magnetização terá decaído de acordo com a constante de tempo T_2 [18] – ver Fig. 2-11.

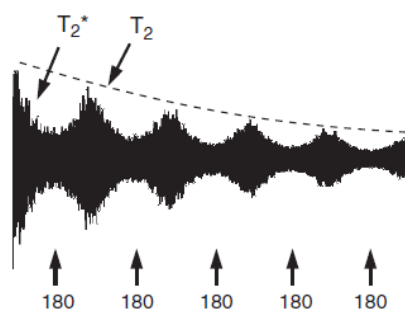


Fig. 2-11 Diminuição da intensidade da magnetização a cada TE, de acordo com a constante de tempo T_2 [18].

A intensidade dos ecos é atenuada pela constante repetição da sequência – τ - 180° - τ antes da aquisição. O problema associado a este método advém do facto de os erros no comprimento do pulso de 180° serem cumulativos, o que conduz a imperfeições no processo de reconstituição da fase à medida que a experiência decorre. Uma melhor implementação deste método consiste, assim, na sequência de *Carr–Purcell–Meiboom–Gill* na qual o pulso de 180° é aplicado em y, ao contrário do que acontecia na sequência de CP, na qual o mesmo era aplicado em x, o que faz com que a recuperação da fase tome lugar no hemisfério positivo de y para cada eco. Desta forma, os erros associados aos comprimentos dos pulsos deixam de ser cumulativos, uma vez que os mesmos em cada eco ímpar são cancelados pelos dos ecos pares – ver Fig. 2-12.

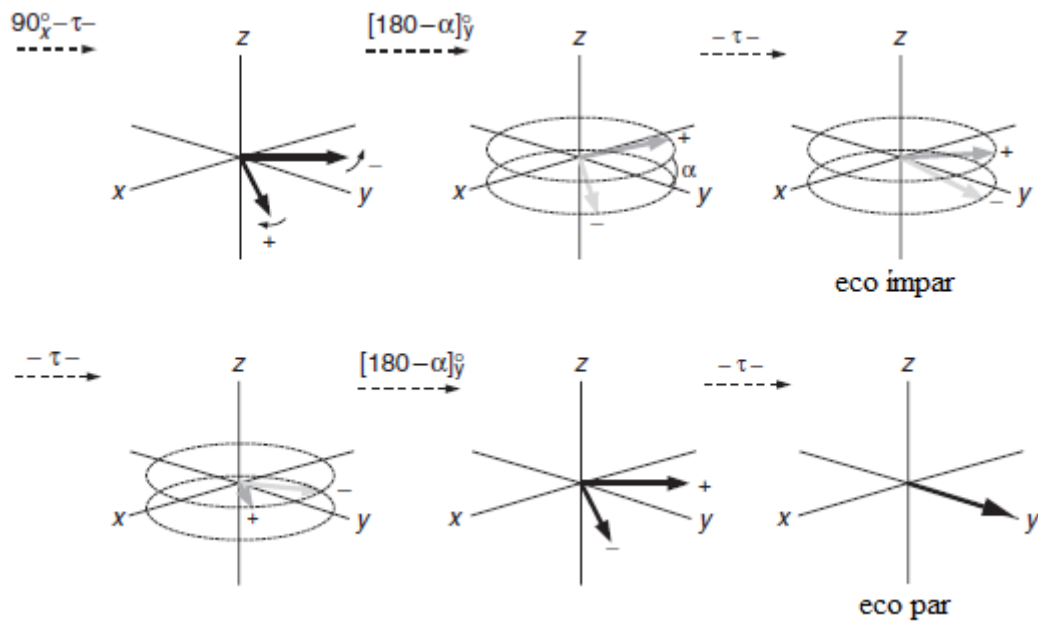


Fig. 2-12 Efeito da sequência de CPMG na presença de imperfeições do pulso de RF. Estas fazem com que a medida de amplitude do ângulo aplicado não seja exatamente de 180° , o que faz com que os vetores fiquem acima (cinzento escuro) ou abaixo (cinzento claro) do plano xy , o que reduz a intensidade dos ecos “ímpares”. Ao se repetir a sequência, os erros são cancelados pelas imperfeições do segundo pulso de 180° , pelo que os ecos “pares” são utilizados para calcular o tempo de relaxação transversal, T_2 [18].

2.1.3. Imagem por RMN

Tal como já foi referido, as imagens adquiridas através desta técnica são obtidas com base na forma como os prótons das moléculas de água, presentes nos tecidos do corpo humano, relaxam aquando da exposição ao campo magnético B_0 e às sequências de pulso utilizadas [1]. As bobinas recetoras medem esta relaxação, a qual é convertida numa imagem através de algoritmos computacionais [1].

O contraste obtido em IRM, num determinado tecido, é influenciado por diversos fatores, nomeadamente pelo seu tempo de relaxação T_1 e T_2 , diferença de densidade protónica, tempo de eco e tempo de repetição (TR) – sendo este último o intervalo de tempo que decorre entre as sequências [4].

Existem, atualmente, diversas sequências de pulso que, combinadas com diferentes tempos de repetição e de eco, permitem a obtenção de imagens com diferentes ponderações e, consequentemente, diferentes contrastes, em função dos objetivos que se perseguem. De facto, a aplicação de curtos TR e TE origina uma imagem ponderada em T_1 . Por outro lado, TR e TE

longos permitem a obtenção de imagens ponderadas em T_2 . A utilização de longos TR e curtos TE possibilitam a criação de imagens ponderadas em densidade protónica – [20] (ver Fig. 2-13).

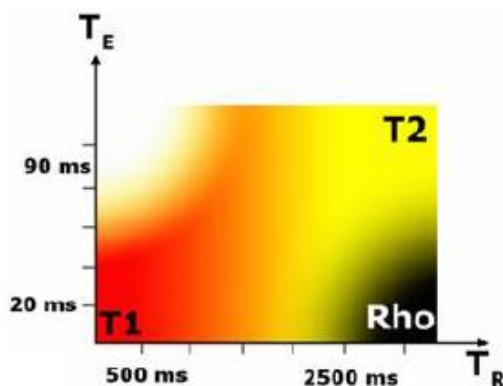


Fig. 2-13 Vários tipos de ponderação em função dos tempos de repetição e de eco. (<https://www.imaaios.com/en/e-Courses/e-MRI/MRI-signal-contrast/Signal-weighting>)

No entanto, tal nem sempre é exequível no período de duração do próprio exame. Por outro lado, a imagem por ressonância magnética não possibilita a determinação rigorosa da patologia em causa, já que várias destas apresentam aparências semelhantes.

2.1.3.1. Agentes de contraste em IRM

Atendendo aos problemas acima enunciados, justifica-se a introdução de agentes de contraste: substâncias aplicadas ao corpo em estudo que interferem ao nível dos tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água, influenciando a intensidade do sinal adquirido e, consequentemente, alterando o contraste da imagem [3]. Destaque-se que é o impacto que têm na relaxação dos prótons das moléculas de água, e não os agentes de contraste por si mesmos, que melhora o contraste em IRM. Por outras palavras, os agentes de contraste não geram sinais, apenas modificam a amplitude dos sinais gerados pelos prótons dos átomos de hidrogénio, na presença de um campo magnético.

A eficiência de um agente de contraste é quantificada pela relaxividade, que pode ser longitudinal (r_1) ou transversal (r_2), e que corresponde a uma medida do aumento, por unidade de concentração de um agente de contraste, da taxa de relaxação do solvente – neste caso água. Esta grandeza pode ser calculada através da seguinte expressão:

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i0}} + r_i C \quad i = 1,2 \quad \text{Eq. 2-6}$$

na qual $i=1,2$ significa longitudinal e transversal, respetivamente; T_{i0} é o tempo de relaxação do sistema antes da adição do agente de contraste; C quantifica a concentração do agente de contraste e r_i a relaxividade [22].

Este parâmetro permite uma outra classificação dos agentes de contraste no que respeita ao efeito que produzem na imagem: agentes de contraste positivos ou agentes de contraste negativos. Os primeiros apresentam baixa razão entre r_2 e r_1 , aumentam a intensidade do sinal, afetando predominantemente o tempo de relaxação T_1 . Já os agentes de contraste negativos, com elevada razão entre r_2 e r_1 , diminuem a intensidade do sinal, tendo um efeito maioritário sobre o tempo de relaxação T_2 e T_2^* – ver Fig. 2-14.

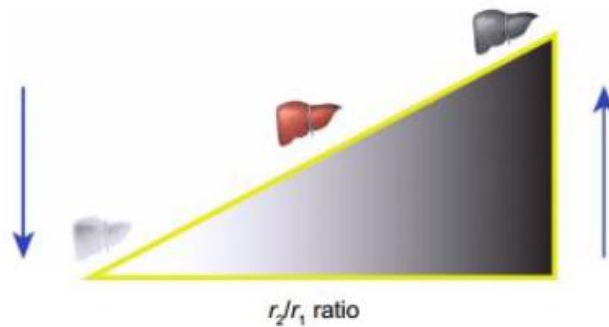


Fig. 2-14 Influência de r_2/r_1 na eficiência do agente de contraste. Nota: elevados valores de r_2/r_1 produzem um sinal hipotenso em imagens ponderadas em T_2 , fazendo com que os órgãos surjam escuros na imagem. Por outro lado, valores de r_2/r_1 pequenos fazem com que os órgãos surjam mais claros e brilhantes nas imagens [23].

A maior parte dos agentes de contraste em uso clínico são baseados em quelatos paramagnéticos de metais lantanídeos, sendo o gadolínio o mais utilizado [4]. Materiais paramagnéticos caracterizam-se pela tendência que os dipolos magnéticos dos átomos que os constituem apresentam para se alinharem com um campo magnético externo; pela pequena suscetibilidade magnética positiva e pela orientação aleatória dos dipolos na ausência de um campo magnético externo [24]. Os metais lantanídeos possuem um ou mais eletrões desemparelhados tendo, cada um, individualmente, momento magnético permanente. Em solução aquosa, surge uma interação magnética dipolar entre o momento magnético dos eletrões da substância paramagnética e os momentos magnéticos dos prótons das moléculas de água vizinhas. Esta interação conduz a uma redução, principalmente, do tempo de relaxação T_1 dos prótons das moléculas de água, já que o momento de dipolo magnético dos eletrões desemparelhados é cerca de 650 vezes superior ao dos

prótons da molécula de água [25]. Uma vez que o seu principal efeito é ao nível do T_1 , são, então, categorizados como agentes de contraste positivo.

Embora os quelatos de gadolínio sejam bastante utilizados, apresentam inconvenientes, nomeadamente dificuldade de deteção da patologia pela qualidade da imagem obtida, curta duração na corrente sanguínea e toxicidade, principalmente em pacientes com insuficiência renal [3, 4].

Desta forma, e de modo a se minimizarem alguns destes problemas, tem-se investigado agentes de contraste à base de nanopartículas [3].

2.1.3.1.1. Nanopartículas como agentes de contraste em IRM

O facto de as nanopartículas limitarem o seu tamanho a algumas dezenas de nanómetros possibilita um aumento do seu tempo de circulação na corrente sanguínea e um controlo mais eficiente no que respeita aos efeitos do contraste e às funções e interações biológicas [3], permitindo funcionar ao nível celular e molecular [4].

Assim, nos últimos anos, o interesse em nanopartículas magnéticas tem vindo a aumentar significativamente devido à sua aplicabilidade em diversas áreas [16], sendo o uso destas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética uma das mais importantes e das que mais rapidamente tem crescido [26]. De facto, as suas nanodimensões dão origem a propriedades magnéticas únicas [4], sendo a combinação, principalmente, destas duas características que faz das nanopartículas magnéticas um agente de contraste tão promissor em aplicações de IRM [4].

Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas, em particular, têm sido extensivamente investigadas como novos agentes de contraste em IRM [4]. De facto, o óxido de ferro é mais biocompatível do que os agentes de contraste baseados em gadolínio ou em magnésio, uma vez que o ferro é bastante abundante no corpo humano [3]. Além disso, as SPIONs apresentam propriedades superparamagnéticas e biodegradabilidade, sendo a sua interface facilmente modificável para melhoria da sua farmacocinética e biodisponibilidade.

2.2. Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas

A nanoestrutura das NPs Fe_3O_4 é baseada num núcleo inorgânico de óxido de ferro, como a magmíte e a magnetite [10], sendo esta última a que detém características magnéticas mais interessantes, uma vez que apresenta catiões de ferro tanto no estado bivalente (Fe^{2+}) como trivalente (Fe^{3+}) [27]. A sua estrutura cristalina encontra-se representada na Fig. 2-15 [27].

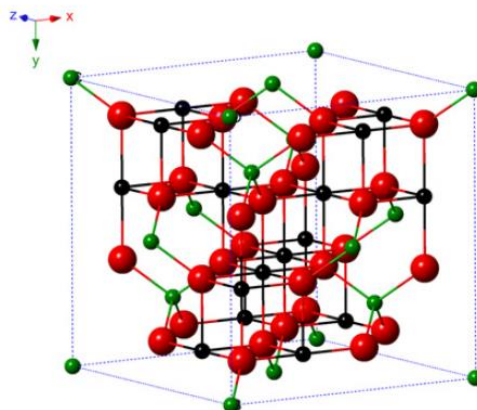


Fig. 2-15 Estrutura da magnetite (os círculos a preto representam Fe^{2+} , os a verde Fe^{3+} e os a vermelho O^{2-}) [27].

Como se pode observar na Fig. 2-15, a magnetite apresenta uma estrutura espinela inversa, na qual o oxigênio forma uma matriz cúbica de face centrada. Nesta, 8 dos 64 possíveis lugares tetraédricos estão ocupados por metade dos iões Fe^{3+} , sendo que a outra metade, juntamente com os iões Fe^{2+} , ocupam 16 dos 32 possíveis sítios octaédricos [3].

2.2.1. Propriedades Magnéticas

Tal como já foi referido, as propriedades magnéticas das SPION são uma das características mais importantes para a sua utilização como agentes de contraste em ressonância magnética. A classificação das propriedades magnéticas dos materiais é baseada na sua suscetibilidade magnética χ , a qual é definida pelo quociente entre a magnetização induzida e a intensidade do campo magnético aplicado [28].

Materiais que apresentam suscetibilidades magnéticas na ordem de 10^{-6} a 10^{-1} são designados paramagnéticos [28]. Estes contêm spins eletrónicos desemparelhados isolados em iões ou moléculas, facto que conduz a um momento magnético total da substância em causa. A direção na qual estes momentos se alinham é independente dos momentos magnéticos das restantes substâncias presentes no material. Assim, sob influência de agitação térmica, todos os momentos magnéticos do material apontam em direções aleatórias – ver Fig. 2-16 a) – e, consequentemente, o material não apresenta, macroscopicamente, um momento magnético espontâneo. No entanto, na presença de um campo magnético externo, os momentos magnéticos do material alinham-se, sendo induzida uma magnetização. Tal alinhamento, contudo, não se mantém quando o campo magnético é removido [29].

Abaixo de uma determinada temperatura, temperatura de *Currie*, a direção dos momentos magnéticos deixa de ser aleatória e estes passam a estar alinhados uns em relação aos outros (ver

Fig. 2-16 b), mesmo na ausência de um campo magnético externo – materiais ferromagnéticos. As interações entre os elétrons do material resultam em estados magnéticos ordenados, isto é, domínios magnéticos, e numa elevada magnetização espontânea [28].

Um caso particular do ferromagnetismo é o ferrimagnetismo. Neste, a interação entre os momentos magnéticos dos átomos resulta num alinhamento antiparalelo – ver Fig. 2-16 c) –, mas o número de momentos e/ou o tamanho dos momentos não é igual. Consequentemente, ocorre também uma magnetização total [29].

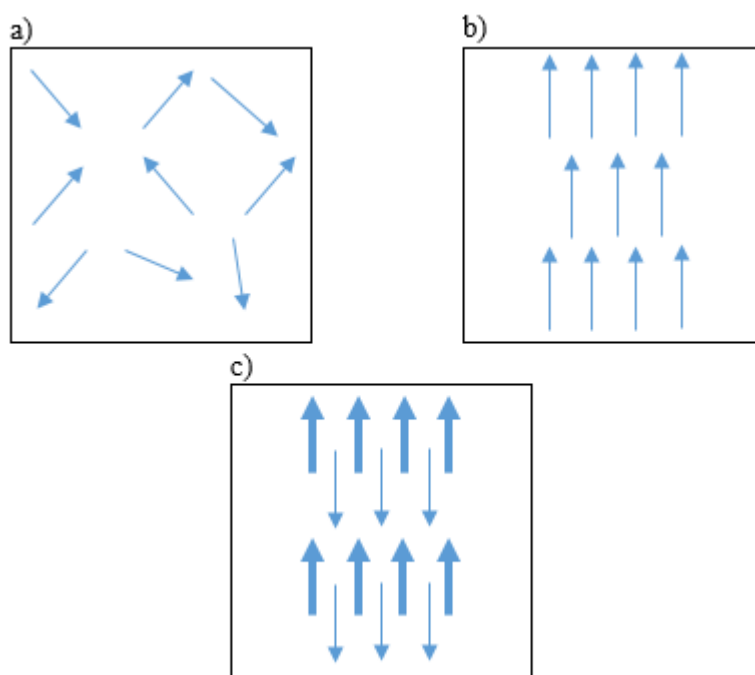


Fig. 2-16 Esquema dos momentos magnéticos a) orientados aleatoriamente em materiais paramagnéticos; b) alinhados paralelamente em materiais ferromagnéticos; c) adjacentes de diferentes magnitudes alinhados antiparalelamente em materiais ferrimagnéticos.

A suscetibilidade dos materiais ferrimagnéticos depende da sua estrutura atômica, temperatura e do campo magnético externo aplicado [28].

Materiais ferrimagnéticos cujos tamanhos se encontram na ordem das dezenas de nanómetros, como as nanopartículas magnéticas, tornam-se domínios magnéticos únicos (*single magnetic domain*) e, consequentemente, mantêm um elevado momento magnético total. Contudo, a temperaturas suficientemente elevadas (temperatura de bloqueio – *blocking temperature*) a energia térmica é suficiente para induzir a rotação livre das partículas, o que resulta na perda da magnetização total na ausência de um campo magnético externo. Esta propriedade superparamagnética permite à partícula manter a sua estabilidade coloidal e evitar agregações, fazendo com que seja possível o seu uso em aplicações biomédicas. As interações presentes neste

domínio magnético único resultam em suscetibilidades magnéticas muito maiores quando comparadas com materiais paramagnéticos [28].

Num regime superparamagnético, as NPs Fe_3O_4 exibem um elevado efeito de contraste em IRM, são facilmente controladas por um gradiente de campo magnético e mostram uma forte resposta magnética em campos magnéticos relativamente baixos [30]. De facto, quando as SPIONs são colocadas num campo magnético externo, os seus momentos magnéticos alinham-se na direção deste e aumentam o fluxo magnético. Esta capacidade de induzir distúrbios no campo magnético local, através dos seus momentos magnéticos, leva a um rápido desfasamento dos prótons envolventes, gerando uma mudança no sinal de RMN detetável [24]. Desta forma, o seu efeito é predominantemente no tempo de relaxação T_2 e, como tal, provocam uma diminuição do sinal, sendo consideradas agentes de contraste negativos.

Além disso, investigações recentes mostram que as propriedades magnéticas das nanopartículas baseadas em óxidos de ferro dependem largamente, para além do seu tamanho, da sua natureza cristalina, da sua composição química, do material de que é feito o seu revestimento e também da espessura do mesmo [31].

2.2.2. Revestimento

A superfície das NPs Fe_3O_4 encontra-se coberta por átomos de ferro que atuam como ácidos de *Lewis*, os quais interagem com moléculas que doam pares de eletrões isolados. Quando as NPs são colocadas em meio aquoso, a superfície do óxido de ferro torna-se funcionalizada com um grupo hidroxilo. Estes são anfotéricos e, desta forma, podem reagir tanto como bases como com ácidos. A superfície das NPs pode ser negativa ou positiva, dependendo do pH da solução. Em torno do ponto isoelétrico da magnetite, o qual se encontra por volta dos 6.8, a densidade de carga da superfície é demasiado pequena e as partículas perdem a sua estabilidade. Deste modo, as NPs tendem a agregar [32], de forma a reduzirem a energia da sua superfície [27]. Tal agregação resulta na mudança das propriedades magnéticas das NPs de superparamagnéticas para ferromagnéticas, devido ao aumento do tamanho [6].

Assim, a instabilidade coloidal das NPs Fe_3O_4 em condições fisiológicas impede a sua aplicação, requerendo o uso de agentes tensioativos biocompatíveis [6], os quais podem ser quimicamente ancorados ou fisicamente adsorvidos à superfície das NPs. Tais revestimentos criam forças repulsivas (principalmente repulsões estereoquímicas) de forma a compensar as forças magnéticas e de *van der Waals* atrativas [32].

Os revestimentos têm, assim, com principal finalidade 1) prevenir a degradação das nanopartículas de óxido de ferro *in vivo*; 2) evitar a agregação destas partículas através da

diminuição das suas interações magnéticas e 3) providenciar grupos funcionais passíveis de se ligarem com compostos bioativos [30].

Assim, enormes progressos têm sido alcançados no que respeita a formulações alternativas e posterior funcionalização de SPIONs, de forma a melhorar a sua dispersão e biocompatibilidade. SPIONs funcionalizadas com dextrano, albumina, silicones, lipossomas, dendrímeros e polietilenoglicol têm sido amplamente usadas como agentes de contraste T_2 , evidenciando elevada eficácia no aumento do contraste das imagens [31].

Dos vários materiais de revestimento biocompatíveis, o ácido oleico é um dos tensioativos mais comumente usados para estabilizar as NPs [7].

2.2.2.1. Ácido Oleico

O ácido oleico é um ácido gordo monossaturado (Fig. 2-17) e permite uma forte ligação entre o grupo carboxilo e as NPs Fe_3O_4 . As NPs modificadas com AO são geralmente monodispersas, providenciando elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade e elevada estabilidade [7].

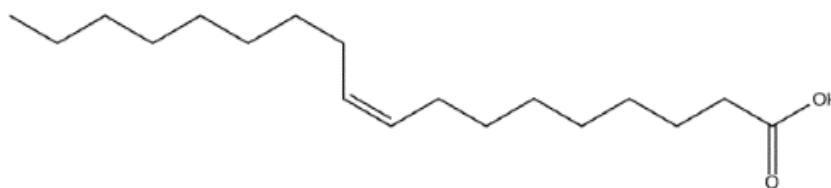


Fig. 2-17 Estrutura química do ácido oleico (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393217.html>).

Quando a massa de ácido oleico utilizado para revestir a superfície das NPs é menor do que 20% da massa de ferro das mesmas, é formada uma monocamada deste ácido, a qual é hidrofóbica [33]. No entanto, para aplicações biomédicas, uma vez que a maior parte do meio biológico é constituído por soluções aquosas, é necessário que o revestimento utilizado seja hidrofílico [34]. No ácido oleico, tal é possível aquando da formação de uma bicamada, com a qual este passa a poder ser disperso em solventes polares com o devido ajuste de pH [6]. De facto, com esta configuração, o segmento hidrofóbico é adsorvido na superfície das NPs, enquanto o grupo hidrofílico se estende na solução aquosa, providenciando uma barreira estereoquímica ou repulsão elétrica, evitando a agregação das NPs [35].

2.2.3. Técnicas de síntese

Para que as nanopartículas de óxido de ferro possam ser utilizadas como agente de contraste, é necessário que a metodologia usada para a sua produção seja capaz de lhes conferir certas propriedades físico-químicas. De entre elas, destacam-se a estabilidade, superparamagnetismo, elevada absorção na região de interesse e cinética favorável, fácil eliminação do corpo e biocompatibilidade [36].

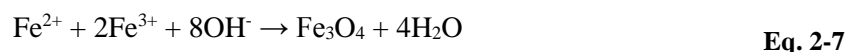
Nas últimas décadas, a síntese de nanopartículas magnéticas tem sido amplamente investigada e diferentes técnicas têm sido desenvolvidas, abrangendo desde métodos físicos a métodos químicos. Em comparação com os métodos físicos, os químicos são, geralmente, mais adequados para a produção de partículas de óxido de ferro superparamagnéticas para aplicações em IRM, uma vez que estes apresentam grandes vantagens no que respeita ao controlo dos seguintes parâmetros das partículas: tamanho e sua distribuição, grau de cristalinidade e grau de pureza [2].

A técnica de precipitação química, devido à sua simplicidade e eficiência [4], é um dos métodos mais importantes e mais usados na obtenção de SPIONs [37].

2.2.3.1. Precipitação química

Não obstante algumas desvantagens desta técnica, que se prendem, essencialmente, com o facto de as partículas formadas serem polidispersas e exibirem heterogeneidades no que respeita ao seu tamanho, para além das vantagens já mencionadas, esta técnica permite a produção de SPIONs em elevadas quantidades [37].

Genericamente, nesta técnica, as SPIONs resultam do controlo da precipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa, estabilizada através da adição de uma solução alcalina num ambiente não oxidável [37]. Esta condição é importante uma vez que sem ela a magnetite pode sofrer oxidação e converter-se em hidróxido de ferro [38]. A reação global pode ser escrita da seguinte forma [39]:



Mais especificamente, o processo de precipitação química envolve duas etapas principais: uma rápida nucleação e um crescimento lento do núcleo. O controlo e distribuição do seu tamanho na primeira fase têm-se mostrado de elevada importância no que concerne à preparação de partículas monodispersas. Relativamente à segunda fase, o crescimento do núcleo tem de ser inibido eficazmente, de forma a obter-se partículas com os tamanhos pretendidos – à nanoescala [37].

O tamanho e a sua distribuição, bem como a forma das nanopartículas, podem ser controlados com relativo sucesso através da seleção do tipo de sais usados (cloretos, sulfatos, nitratos,

percloratos, etc.), pelo ajuste da razão de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, da temperatura da reação, do valor do pH, da força da base usada, da força iónica do meio e pela adição de quelatos (como ácido cítrico, oleico ou glucónico) ou revestimentos à base de polímeros (como polivinilpirrolidona (PVP), dextrano e álcool polivinílico (PVA)) [2, 37].

A concentração dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} , no entanto, é o parâmetro que mais influencia o tamanho global das nanopartículas. Se as concentrações forem baixas, tal resulta num crescimento limitado das partículas, embora os seus tamanhos sejam mais uniformes. Por outro lado, se a concentração destes sais for mais elevada, serão produzidas partículas com dimensões superiores, ainda que com tamanhos mais heterogéneos [40].

Nanopartículas de Óxido de Ferro

No presente capítulo apresentam-se os materiais e os procedimentos utilizados para a síntese das nanopartículas de óxido de ferro e para o cálculo da concentração de ferro nelas presentes. Além disso, faz-se ainda uma descrição dos equipamentos e parâmetros utilizados para a caracterização das nanopartículas e, por fim, uma análise e discussão dos resultados provenientes dessas caracterizações.

3.1. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro a 25°C

As nanopartículas de óxido de ferro, que se constituíram o foco da presente dissertação, foram sintetizadas através do método da precipitação química. Após a sua síntese, estas foram revestidas com diferentes quantidades de ácido oleico em função da sua massa de nanopartículas – 64%, 96%, 128% e 192% ou dioctil sulfosuccinato de colina (chAOT) – 100% e 200%.

3.1.1. Materiais

Para a síntese das NPs Fe_3O_4 utilizou-se cloreto de ferro hexahidratado (*Sigma-Aldrich*), cloreto de ferro tetra hidratado (*Sigma-Aldrich*), uma solução aquosa de amónia a 25% (*Panreac*), água ultrapura, ácido oleico (*Fisher Chemical*) e dioctil sulfosuccinato de colina – sintetizado no grupo de LabNMR-Cenimat.

3.1.2. Procedimento

O procedimento utilizado resulta de uma adaptação do protocolo usado pela equipa de Gnanaprakash [41]. Em 100 mL de água ultrapura dissolveram-se, num balão de três tubuladuras e em atmosfera de azoto, 5 mmol de cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 2,5 mmol de cloreto de ferro tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Seguidamente, e sob agitação mecânica a 1000 rpm, adicionou-se 10 mL de solução de NH_4OH a 25%. Este processo de agitação decorreu durante 5 min. Findo este período de tempo, colocou-se a solução sob um íman, tendo-se adicionado água

ultrapura de forma a parar a reação. Após a deposição das NPs, retirou-se a água da superfície e repetiu-se o processo de lavagem das mesmas três vezes.

Findo este processo, procedeu-se ao cálculo da concentração das nanopartículas através do método colorimétrico da 1,10-fenantrolina, descrito em 3.3.

Posteriormente, dividiu-se a solução equitativamente por dois recipientes de modo a que, a partir de uma só síntese, fosse possível revestir as NPs com duas quantidades diferentes de ácido oleico ou com choline AOT. O revestimento foi adicionado às soluções nas concentrações pretendidas sob agitação mecânica a 400 rpm, no caso de este ser ácido oleico, e a 250 rpm, no caso de o mesmo ser chAOT, ambos durante 1 hora.

Realce-se que os pares das soluções de nanopartículas (Fe_3O_4 64%, Fe_3O_4 96%) e (Fe_3O_4 128%, Fe_3O_4 192%) provêm da mesma síntese.

3.2. Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro a 80°C

Com o objetivo de se analisar o efeito da temperatura na estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro aquando da síntese das mesmas, foram realizadas duas outras sínteses, cujo procedimento é em tudo igual ao descrito na síntese de nanopartículas a 25°C, com a exceção de terem sido realizadas em banho de óleo a 80°C. Note-se, ainda, que estas duas novas sínteses diferem uma da outra pelo facto de, numa delas, o ácido oleico (64%) ter sido adicionado imediatamente após a adição da amónia a 25%.

3.3. Determinação da Concentração de Ferro

Para a determinação da concentração das NPs Fe_3O_4 previamente sintetizadas, necessária para aferir a quantidade de ácido oleico ou chAOT que se pretende adicionar, recorreu-se ao método colorimétrico da 1,10-fenantrolina [42].

3.3.1. Materiais

O ácido clorídrico (*Panreac*), o ácido clorídrico 37% V/V (*Carlo Erba*), a hidroxilamina (*Alfa Aesae*), a fenantrolina (*Applichem*) e o acetato de amónia (*Sigma-Aldrich*) foram os reagentes utilizados para determinar a concentração das NPs Fe_3O_4 .

3.3.2. Procedimento

Para a determinação da concentração das NPs, foi necessária a preparação de uma solução de hidroxilamina (100 mg/mL), outra de fenantrolina (3 mg/mL), e ainda uma solução de acetato de amónia (500 mM), todas em ácido clorídrico (HCl 0,01 N) previamente diluído em água ultrapura.

Terminadas as soluções, pipetaram-se 40 µL das NPs previamente sintetizadas diluídas em água ultrapura numa proporção de 1:500 e 20 µL de ácido clorídrico 37% V/V para um *eppendorf*, o qual foi incubado por 1 h. Seguidamente, adicionou-se 100 µL da solução de hidroxilamina e 500 µL da de fenantrolina. Por fim, e de forma a perfazer um volume total de 1800 µL, no *eppendorf*, juntou-se 1140 µL da solução de acetato de amónia.

Posteriormente, procedeu-se à medição da absorvância da amostra a 510 nm, utilizando-se um espectrofotómetro UV-VIS (*T90+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd*). Repare-se que, com o intuito de minimizar erros inerentes a uma única leitura, todo este procedimento foi replicado em quatro *eppendorffs* diferentes.

A concentração de ferro nas amostras foi calculada através de uma reta de calibração, cuja equação é:

$$Abs = 4,5079[Fe] + 0,0753 \quad \text{Eq. 3-1}$$

onde Abs representa a absorvância da amostra a 510 nm e [Fe] a concentração de ferro em mg/mL.

De forma a obter-se a concentração das nanopartículas, recorreu-se à fórmula $[Fe] = 0.7 \times [NPs]$ [43].

3.4. Caracterização

As propriedades físico-químicas das nanopartículas podem afetar drasticamente o comportamento das mesmas quando utilizadas em sistemas biológicos e ainda determinar a sua biodistribuição, segurança e eficácia [44]. Assim, dada a influência das referidas propriedades, é essencial efetuar-se a caracterização das nanopartículas, nomeadamente, no que concerne ao seu tamanho, à sua distribuição e estado de agregação, à sua morfologia e à sua estrutura [44].

Para efetuar a caracterização das nanopartículas de óxidos de ferro usadas como agentes de contraste em IRM, é necessário recorrer-se a diversas técnicas [45]. De entre estas, destaca-se a dispersão dinâmica de luz (do inglês DLS, *Dynamic Light Scattering*), a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a análise termogravimétrica (TGA), a microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e a difração de raios-X (DRX).

3.4.1. Dispersão Dinâmica de luz e Potencial Zeta

O equipamento utilizado para as medidas de dispersão dinâmica de luz – através das quais é possível inferir o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas previamente sintetizadas – e para o potencial zeta – útil para averiguar a estabilidade das nanopartículas em função do pH – foi o *SZ-100 nanopartica series (Horiba, Lda)*, com um laser de 532 nm. Em relação ao primeiro conjunto de medições, a medida de amplitude do ângulo de dispersão era de 90° e foi utilizada uma célula descartável, enquanto as medidas do potencial zeta foram realizadas numa célula de grafite e a medida de amplitude do ângulo de dispersão era de 173°.

3.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros obtidos pela técnica de FTIR foram utilizados para inferir o tipo de ligações químicas presentes nas nanopartículas previamente sintetizadas e liofilizadas. Estes foram adquiridos numa gama de números de onda entre os 4000 cm^{-1} e os 480 cm^{-1} , com um ângulo de incidência com uma medida de amplitude de 45°, através do espectrofotómetro *ATR-FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectrometer*.

3.4.3. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica, útil para se compreender a estabilidade térmica e composição de uma amostra, através da variação de massa da mesma quando submetida a um gradiente de temperatura, foi realizada através do equipamento *NETZSCH*, modelo STA 449F3. A temperatura a que se iniciou a aquisição foi de 25°C, tendo-se terminado aos 900°C, com uma taxa de 10°C/min. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de azoto. As nanopartículas analisadas foram liofilizadas previamente.

3.4.4. Difração por Raios-X

A técnica de difração por raios-X foi empregue para averiguar a estrutura cristalina das nanopartículas com diferentes concentrações de ácido oleico, previamente sintetizadas, bem como o diâmetro do respetivo cristalito. Os padrões de difração das mesmas foram adquiridos no difratómetro de raios-X *X'Pert PRO PANalytical*, com um intervalo de 2θ de 0,033, desde os 15° aos 80°, através de radiação Cu-K α ($k = 1.54060 \text{ \AA}$). Note-se que, para esta caracterização, foi necessária uma prévia liofilização das nanopartículas.

3.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise por TEM das amostras das nanopartículas sintetizadas foi realizada no Instituto Superior Técnico, no equipamento *Hitachi H-8100 II*, com emissão termiônica, LaB6, e resolução ponto a ponto de 2,7 Å. Para a realização desta análise, utilizada para a obtenção de imagens a partir das quais é possível avaliar a morfologia e tamanho das nanopartículas de magnetite, as amostras estudadas encontravam-se suspensas em água ultrapura, tendo sido colocadas numa rede de carbono.

3.5. Análise e Discussão de Resultados

3.5.1. Concentrações

Na Tabela 3-1 encontram-se as concentrações de ferro e de nanopartículas, bem como a de ácido oleico adicionada a cada uma das quatro soluções sintetizadas a 25°C.

Tabela 3-1 Concentrações de ferro, nanopartículas e ácido oleico nas soluções iniciais das nanopartículas sintetizadas a 25°C.

	Ferro (mg/mL)	Nanopartículas (mg/mL)	Ácido Oleico (mM)
Fe₃O₄ AO 64%	4,7	6,7	15
Fe₃O₄ AO 96%	5,2	7,5	25
Fe₃O₄ AO 128%	2,1	3,0	13
Fe₃O₄ AO 192%	2,7	3,8	26

Pela análise da tabela anterior é possível identificar duas situações, A e B, que se replicam emparelhadamente:

- Em relação à situação A, a concentração de nanopartículas de óxido de ferro é semelhante entre Fe₃O₄ AO 64% e Fe₃O₄ AO 96%, por um lado, e entre Fe₃O₄ AO 128% e Fe₃O₄ AO 192% por outro, variando a concentração de ácido oleico.
- Relativamente à situação B, a concentração de ácido oleico é similar (entre Fe₃O₄ AO 64% e Fe₃O₄ AO 128%, por um lado, e entre Fe₃O₄ AO 96% e Fe₃O₄ AO 192%, por outro), alterando concentração de nanopartículas de óxido de ferro.

A Tabela 3-2 apresenta os valores das concentrações de ferro e de nanopartículas da solução inicial, assim como a concentração de ácido oleico adicionado, na síntese a 80°, após o processo de lavagem das mesmas.

Tabela 3-2 Concentrações de ferro, nanopartículas e ácido oleico na solução inicial das nanopartículas sintetizadas a 80°C.

	Ferro (mg/mL)	Nanopartículas (mg/mL)	Ácido Oleico (mM)
Fe₃O₄ AO 64%	8,3	12	27

Para as nanopartículas sintetizadas a 80°C, mas com adição imediata de ácido oleico, foi adicionada a mesma quantidade de ácido oleico referida na Tabela 3-2.

Já na Tabela 3-3 mostram-se os valores das concentrações de ferro e de nanopartículas, bem como de chAOT adicionadas a cada uma das duas soluções sintetizadas a 25°C.

Tabela 3-3 Concentrações de ferro, nanopartículas e chAOT nas soluções iniciais das nanopartículas sintetizadas a 25°C.

	Ferro (mg/mL)	Nanopartículas (mg/mL)	chAOT (mg/mL)
Fe₃O₄ chAOT 100%	2,8	4,0	4,0
Fe₃O₄ chAOT 200%	1,9	2,7	5,4

3.5.2. Dispersão Dinâmica de Luz e Potencial Zeta

De forma a determinar o tamanho das nanopartículas sintetizadas e a compreender o efeito do revestimento na estabilidade das NPs Fe₃O₄ suspensas em água, estas foram avaliadas através de DLS e de potencial zeta.

Partículas em suspensão/solução estão sujeitas ao movimento browniano, o qual é induzido pelas moléculas do solvente, as quais também se encontram em movimento devido à sua energia cinética. Se tais partículas forem iluminadas por um laser, a intensidade da luz dispersa flutua a uma taxa que é dependente do seu tamanho [46]. O DLS baseia-se na medição dessa dispersão, através da modulação da intensidade da luz dispersa em função do tempo, a qual é utilizada para gerar uma função de autocorrelação (FAC) [47]. Esta deve corresponder a uma única função de decaimento exponencial para soluções monodispersas [46].

Ao ajustar a FAC a uma função exponencial, é possível extrair o coeficiente de difusão da amostra em estudo [46] o qual, inserido na equação de *Stokes-Einstein* – dada por:

$$D_h = \frac{K_B T}{3 \pi \eta D} \quad \text{Eq. 3-2}$$

onde K_B representa a constante de *Boltzman*; T a temperatura absoluta, η a viscosidade do fluido e D o coeficiente de difusão – permite obter o diâmetro hidrodinâmico, D_h das nanopartículas [48].

3.5.2.1. Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas Sintetizadas a 25°C

A Fig. 3-1 representa a função de autocorrelação de diferentes concentrações de NPs Fe_3O_4 revestidas com 64% de ácido oleico sintetizadas a 25°C. Pela análise da mesma, é possível verificar-se que, quando estas se encontram em concentrações mais baixas – [8,4 – 34 μM] – as suas FAC apresentam somente um modo de relaxação, caracterizado por um único decaimento exponencial. Por outro lado, para as restantes concentrações analisadas – [84 – 168 μM] –, as FAC possuem dois modos de relaxação. Tal significa que se está na presença de partículas com diferentes tamanhos [48] sendo que, neste caso, se atribui tal facto à presença de agregados formados pelas próprias nanopartículas, os quais podem comprometer a estabilidade coloidal das mesmas [6].

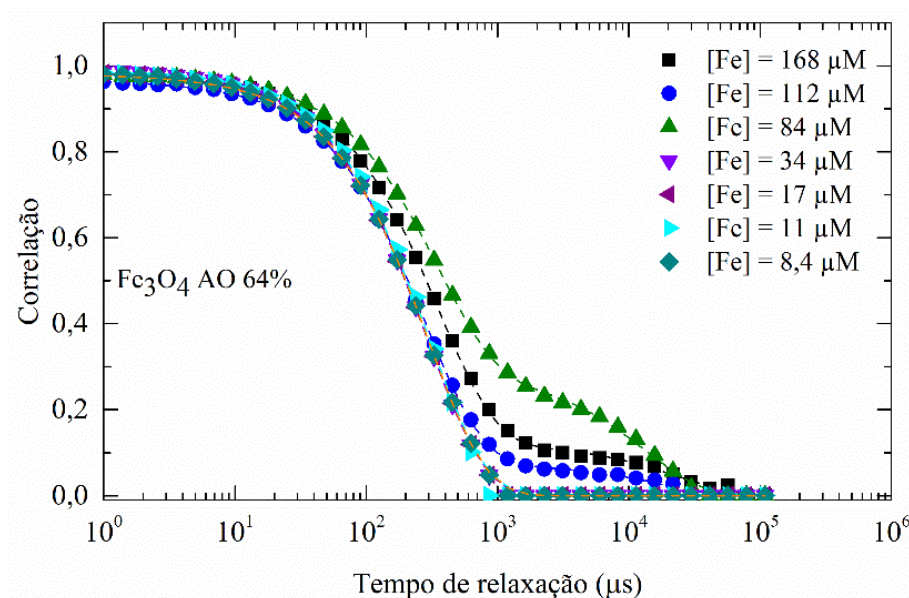


Fig. 3-1 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe_3O_4 AO 64%, para diferentes concentrações de ferro.

Assim sendo, e dados estes resultados, para os restantes tipos de nanopartículas sintetizadas, apenas foram realizadas medições por DLS para as concentrações nas quais não se observou a presença de agregados de nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com 64% de ácido oleico (NPs Fe_3O_4 AO 64%).

As funções de autocorrelação das nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com 96%, 128% e 192% encontram-se representadas na Fig. 3-2 a, b e c, respetivamente. A partir desta, constata-se que, para as concentrações de ácido oleico em questão, as nanopartículas se encontram estáveis, isto é, sem grandes agregados, para todas as concentrações de ferro analisadas, não havendo diferenças significativas nas funções de autocorrelação das mesmas (ver Fig. 3-3).

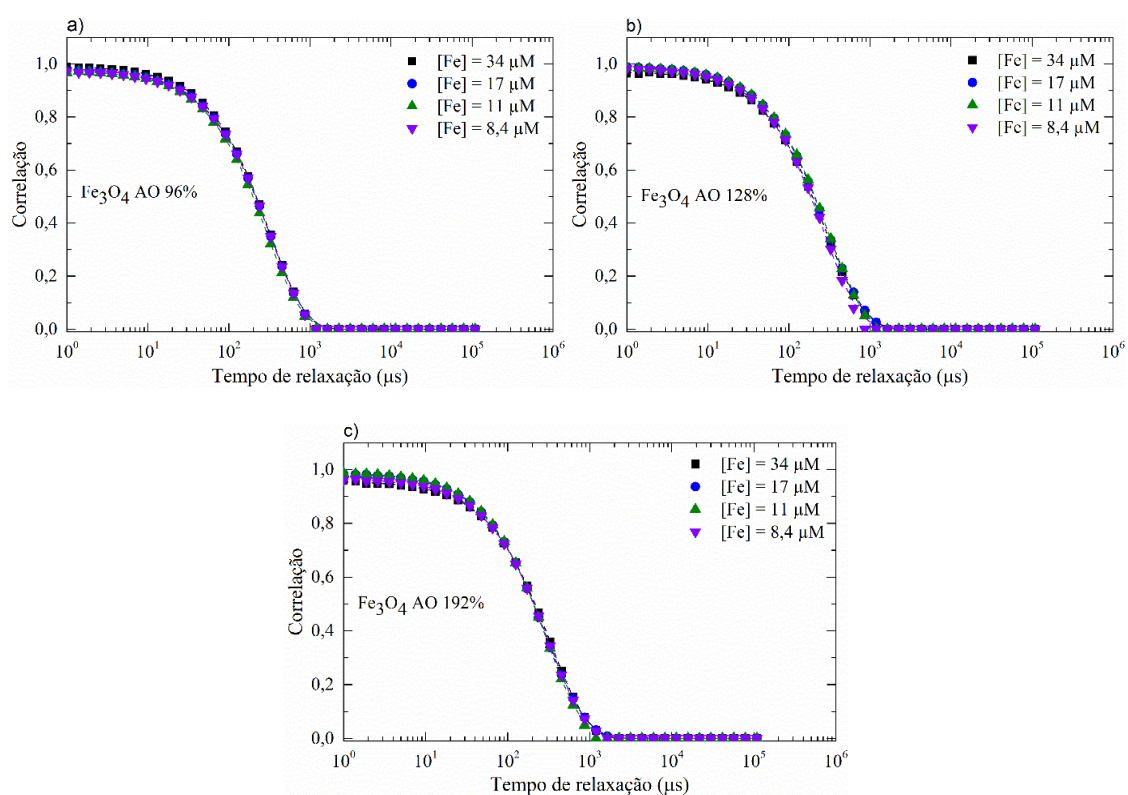


Fig. 3-2 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de a) NPs Fe_3O_4 AO 96%, b) NPs Fe_3O_4 AO 128% e c) Fe_3O_4 AO 192%, para diferentes concentrações de ferro.

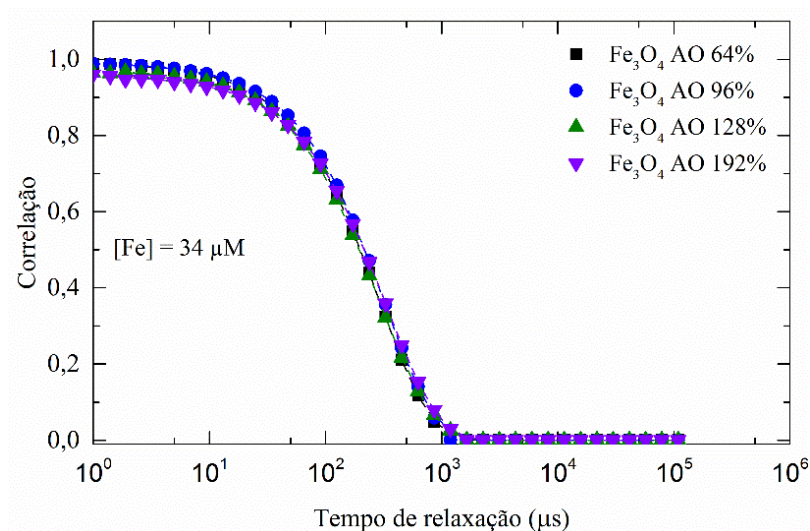


Fig. 3-3 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe₃O₄ AO 64%, 96%, 128% e 192%, para uma mesma concentração de ferro.

Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos, calculados para as nanopartículas em questão, juntamente com os seus índices de polidispersão, os quais correspondem à largura da distribuição do tamanho das partículas em análise [47], encontram-se apresentados na Tabela 3-4.

Tabela 3-4 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e respetivos desvios padrões de NPs Fe₃O₄ revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

	Fe ₃ O ₄ AO 64%	Fe ₃ O ₄ AO 96%	Fe ₃ O ₄ AO 128%	Fe ₃ O ₄ AO 192%
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	144 ± 2,00	155 ± 5,74	160 ± 23,7	171 ± 27,2
Índice de Polidispersão	0,125 ± 0,0372	0,118 ± 0,0186	0,136 ± 0,0328	0,168 ± 0,0604

Pela análise desta, é possível verificar que existe uma relação direta entre o aumento da concentração de ácido oleico e o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas. Uma possível justificação é o facto de, na solução com 192% de ácido oleico, por exemplo, haver, à partida, mais nanopartículas revestidas com este tensioativo do que aquelas que apresentam menor concentração deste. Assim sendo, irão existir mais nanopartículas cujo diâmetro hidrodinâmico é superior ao tamanho daquelas que não se encontram revestidas. Como tal, o tamanho dos agregados irá, consequentemente, ser maior.

Apesar disso, a análise dos índices de polidispersão indica que se trata de soluções monodispersas [47].

3.5.2.2. Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas Sintetizadas a 80°C

Com o intuito de se aferir o efeito da temperatura na estabilidade das NPs, foram realizadas duas sínteses a 80°C, sendo que as NPs assim produzidas foram também analisadas através de DLS.

As figuras seguintes representam as funções de autocorrelação das NPs Fe₃O₄ AO 64% com adição imediata de ácido oleico – Fe₃O₄ AO 64% Imediato, Fig. 3-4 a) – e das NPs Fe₃O₄ AO 64% após processo de lavagem – Fig. 3-4 b) –, para diferentes concentrações de ferro.

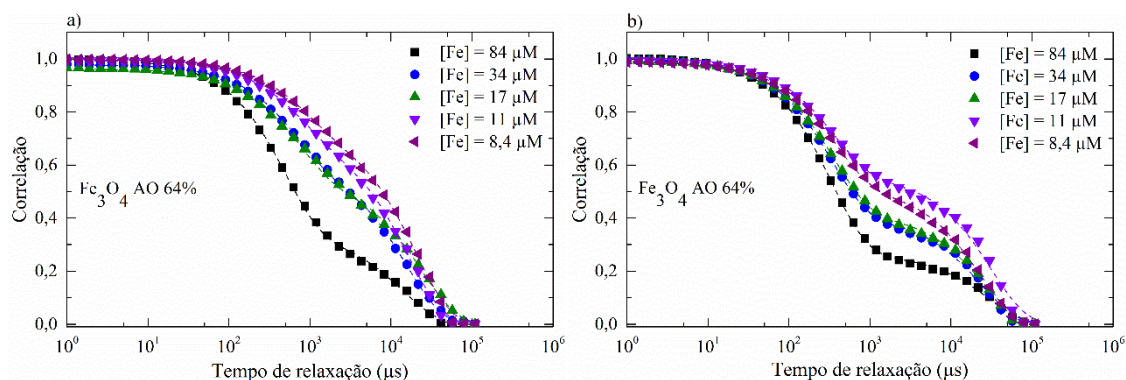


Fig. 3-4 Funções de autocorrelação das NPs Fe₃O₄ AO 64% com a) adição imediata de ácido oleico e com b) adição após o processo de lavagem, sintetizadas a 80°C, para diferentes concentrações de ferro

De entre as concentrações analisadas, a solução mais concentrada [84 μM] é a que apresenta melhores resultados para ambas as sínteses a 80°C, uma vez que o índice de polidispersão das restantes concentrações é sempre superior a 1. Tal facto indica que as amostras apresentam uma distribuição de tamanhos muito ampla, não sendo adequadas para análise pela técnica de dispersão dinâmica de luz [46]. Ainda assim, é visível a presença de grandes agregados em ambas as figuras para uma concentração de ferro de 84 μM. Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos para esta concentração, os quais não contabilizam os grandes agregados, bem como os índices de polidispersão para ambas as amostras encontram-se na Tabela 3-5.

Tabela 3-5 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e respetivos desvios padrões das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com 64% de ácido oleico, sintetizadas a 80°C, com adição imediata de ácido oleico e após o processo de lavagem.

	Fe ₃ O ₄ AO 64% Imediato	Fe ₃ O ₄ AO 64% Após lavagem
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	244 ± 4,38	162 ± 4,35
Índice de polidispersão	0,662 ± 0,0409	0,691 ± 0,142

Repare-se que o diâmetro hidrodinâmico das NPs sintetizadas com adição imediata de ácido oleico é significativamente maior do que o das NPs sintetizadas com adição do revestimento apenas após o processo de lavagem das mesmas. Como a solução de amônia não foi retirada para o primeiro caso, o pH da solução manteve-se básico. Esta relação entre o aumento do tamanho das nanopartículas com o aumento do pH pode ser devida a uma diminuição da carga nas partículas de óxido de ferro, o que permite o crescimento das mesmas por agregação e à hidrólise e precipitação do ferro dissolvido [49]. De acordo com Suga *et al* [50], o pH da solução também influencia a forma e a dimensão dos agregados formados pelas moléculas de ácido oleico, os quais também podem contribuir para a variação de tamanhos observada.

É ainda de realçar que, comparativamente às NPs sintetizadas a 25°C, e para a mesma concentração de ácido oleico (64%), o tamanho hidrodinâmico das NPs sintetizadas a 80°C é superior. Tal efeito vai ao encontro do observado por Mahdavi *et al.* [10], que estudaram o efeito de diversas temperaturas – 25°C, 45°C, 65°C e 85°C – aquando da síntese de nanopartículas de óxido de ferro por precipitação química revestidas com ácido oleico. De facto, os autores verificaram uma diminuição do tamanho do cristalito das NPs quando a temperatura de reação aumentava de 25°C para 45°C, enquanto que, quando a mesma era aumentada para 85°C, ocorria um aumento do tamanho do mesmo. Ainda de acordo com Mahdavi *et al* [10], o aumento da temperatura de reação reduziria a extensão da agregação dos núcleos das nanopartículas de óxido de ferro, reduzindo o tamanho das mesmas. Contudo, o crescimento do núcleo das NPs Fe₃O₄ é mais plausível de ocorrer quando a temperatura no início da síntese é superior a 45°C, o que resulta em NPs maiores. Uma possível explicação para tal é o aumento da energia da solução proveniente do aumento da temperatura de reação, o que aumenta a mobilidade das NPs, provocando um maior número de colisões entre as partículas, e, portanto, aumentando o seu tamanho final.

Uma vez que tanto os diâmetros hidrodinâmicos como os índices de polidispersão das NPs sintetizadas a 25°C se mostraram mais promissores do que os obtidos para as NPs sintetizadas a 80°C, apenas se continuou o estudo para as primeiras.

3.5.2.3. Dispersão Dinâmica de Luz de Nanopartículas revestidas com chAOT

Os líquidos iónicos, em particular os baseados em imidazol, têm surgido como uma alternativa a outros agentes estabilizantes, como polímeros e tensoativos, tendo-se provado eficazes na prevenção da aglomeração de nanopartículas metálicas em solução, nomeadamente de nanopartículas de óxido de ferro, sendo uma das classes mais importantes e investigadas para este propósito [51].

Líquidos iônicos (LI) são sais, os quais são compostos por pares de íons inorgânicos ou orgânicos. Por definição, o seu ponto de fusão é inferior a 100°C, sendo tipicamente líquidos à temperatura ambiente [52]. Tais compostos apresentam propriedades únicas, como elevada polaridade, elevada constante dielétrica e rede supramolecular [53]. Além disso, apresentam ainda baixa toxicidade [54].

Sistemas híbridos de líquidos iônicos e NPs são governados por uma combinação de efeitos de inúmeras interações intermoleculares entre os seus constituintes, nomeadamente interações de *van der Waals*, electrostáticas, estruturais, estereoquímicas e pontes de hidrogénio [52].

Dado o exposto, e com o objetivo de estudar o efeito de outros revestimentos para além do ácido oleico na estabilidade e prevenção de aglomeração de nanopartículas de óxido de ferro, foram ainda realizadas duas sínteses, nas quais as NPs foram revestidas com um LI, mais concretamente dioctil sulfosuccinato de colina (chAOT).

A Fig. 3-5 representa as funções de autocorrelação de NPs Fe₃O₄ chAOT 100% para diferentes concentrações de ferro.

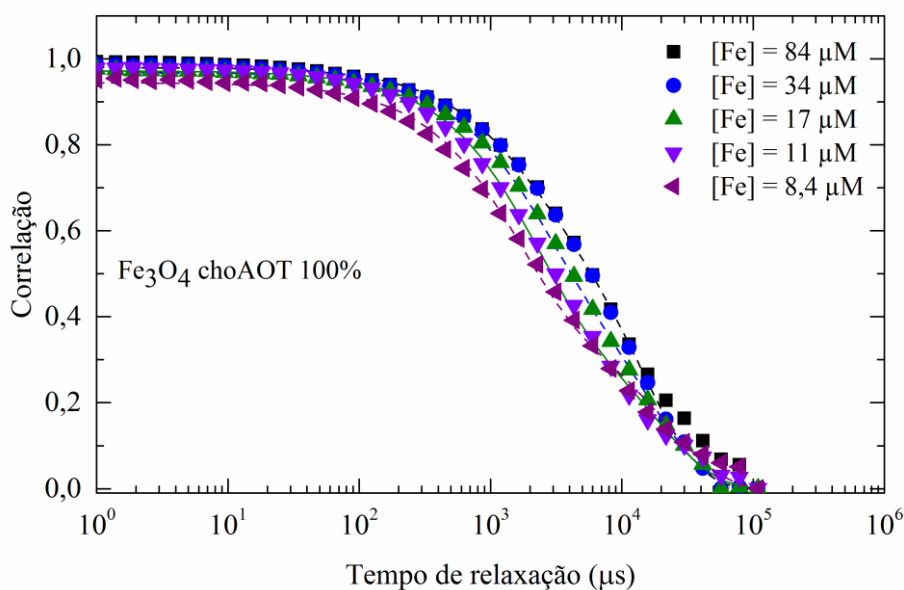


Fig. 3-5 Funções de autocorrelação das NPs Fe₃O₄ chAOT 100%, para diferentes concentrações de ferro.

Para todas as concentrações apresentadas, o índice de polidispersão é superior a 0,7 – ver Tabela 3-6 – pelo que, e à semelhança do verificado para as NPs provenientes da síntese a 80°C, as amostras apresentam uma distribuição de tamanhos muito ampla, não sendo adequadas para análise pela técnica de dispersão dinâmica de luz [46]. Além disso, observou-se ainda, a olho nu, a deposição das nanopartículas sintetizadas.

Tabela 3-6 Índices de polidispersão para as diversas concentrações de ferro analisadas por DLS, relativos às NPs Fe_3O_4 chAOT 100%

	84 μM	34 μM	17 μM	11 μM	8,4 μM
Índice de polidispersão	$1,39 \pm 0,440$	$1,16 \pm 0,398$	$0,954 \pm 0,192$	$1,07 \pm 0,371$	$0,887 \pm 0,250$

Dado os resultados, ponderou-se o facto de a quantidade de líquido iónico adicionado não ter sido suficiente para providenciar uma boa estabilização das NPs. Como tal, na segunda síntese adicionou-se o dobro de chAOT relativamente à massa de nanopartículas calculada pelo método da fenantrolina. A Fig. 3-6 representa as funções de autocorrelação de NPs Fe_3O_4 chAOT 200%, para diferentes concentrações de ferro.

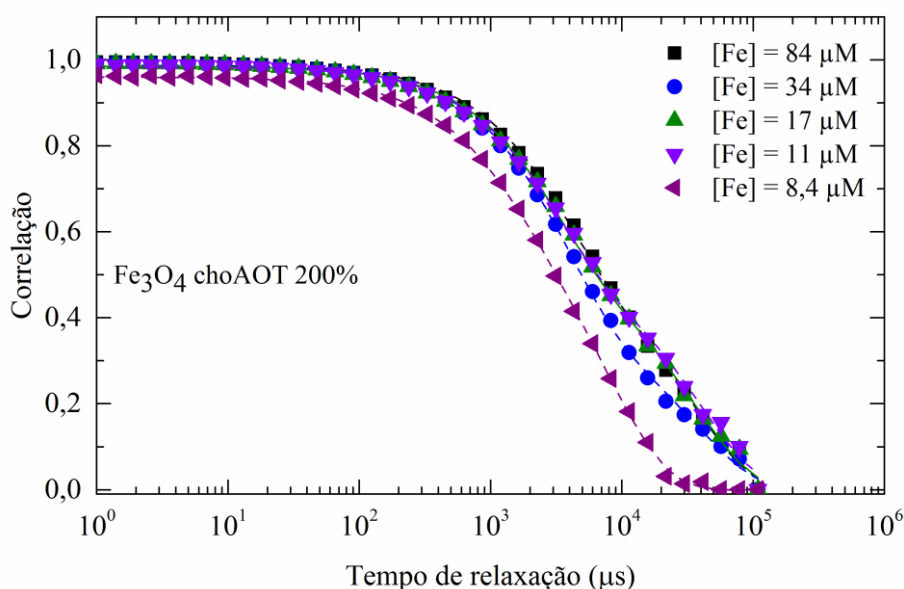


Fig. 3-6 Funções de autocorrelação das NPs Fe_3O_4 chAOT 200%, para diferentes concentrações de ferro.

No entanto, os índices de polidispersão continuam superiores a 0,7 para todas as concentrações de ferro estudadas – ver Tabela 3-7. Também se manteve o fenómeno de sedimentação visível a olho nu.

Tabela 3-7 Índices de polidispersão para as diversas concentrações de ferro analisadas por DLS, relativos às NPs Fe_3O_4 chAOT 200%

	84 μM	34 μM	17 μM	11 μM	8,4 μM
Índice de polidispersão	$1,02 \pm 0,0714$	$1,22 \pm 0,436$	$1,31 \pm 0,364$	$1,54 \pm 0,271$	$0,956 \pm 0,0538$

Tendo em conta os resultados obtidos, estas NPs não foram utilizadas para o estudo de RMN. Tanto neste caso como no anterior (síntese a 80°C) será necessário fazer mais estudos por forma a otimizar o diâmetro e a estabilidade das nanopartículas.

3.5.3. Potencial Zeta

Numa solução iónica, nanopartículas carregadas irão possuir uma camada de iões (de carga oposta) fortemente ligada à sua superfície (camada de *Stern*) e uma segunda camada composta por iões fracamente a elas associados, as quais formam uma dupla camada elétrica. À medida que as partículas se movem, devido ao movimento browniano, uma distinção é criada entre os iões da camada que se move com a partícula e os iões que se mantêm no meio dispersante (solução). O potencial eletrostático criado nesta fronteira (plano de cisalhamento) é denominado potencial zeta, o qual está, portanto, relacionado com a carga da superfície das nanopartículas [55] – ver Fig. 3-7.

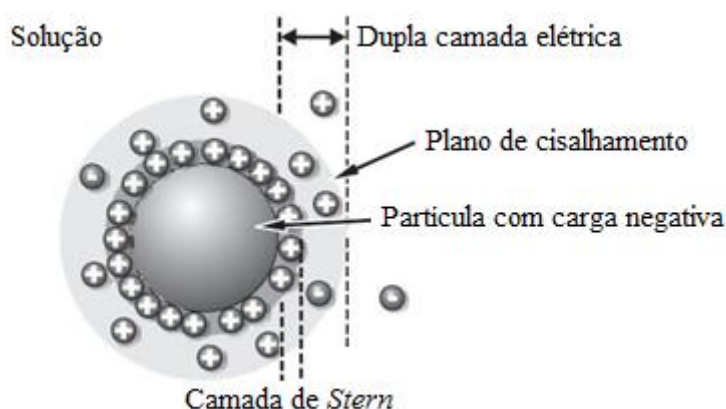


Fig. 3-7 Dupla camada elétrica que circunda a superfície das nanopartículas (imagem adaptada de [56]).

De forma a avaliar a estabilidade das nanopartículas de Fe_3O_4 AO 64%, foram efetuadas medições de potencial zeta, sendo a estabilidade favorável se este se encontrar acima de $\pm 30\text{mV}$ [57].

Para tal, foram preparadas diversas soluções das nanopartículas em questão com uma concentração de ferro de $33,5\ \mu\text{M}$, as quais sofreram ajustes de pH. Em paralelo a estas medições, foram ainda recolhidas as funções de autocorrelação das nanopartículas para os vários valores de pH analisados (ver Fig. 3-8), de forma a se poderem extrair informações acerca da variação do tamanho das mesmas em função destes.

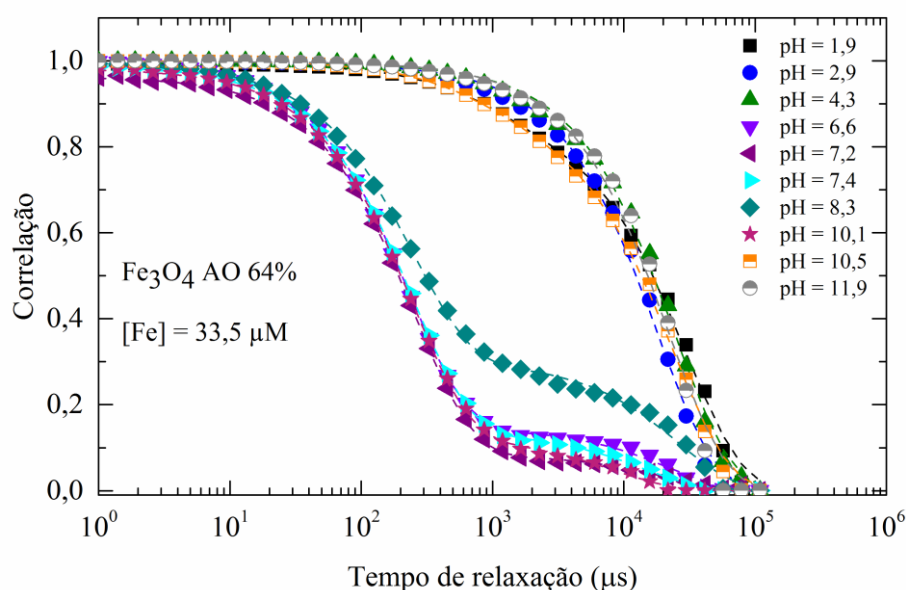


Fig. 3-8 Comparação das curvas de autocorrelação medidas (pontos) e ajustadas (linhas a tracejado) através da técnica de dispersão dinâmica de luz de NPs Fe_3O_4 AO 64% para uma concentração de ferro de 33,5 mM, a diferentes pH.

Para valores de pH abaixo de 6,5 e acima de 10,5, inclusive, o índice de polidispersão encontra-se muito acima de 0,7 – ver Tabela 3-8 –, o que indica que as amostras apresentam uma distribuição de tamanhos muito ampla, sendo francamente polidispersas [46].

Tabela 3-8 Índice de polidispersão das soluções com pH 1,9; 2,9; 4,3; 10,5 e 11,9.

	1,9	2,9	4,3	10,5	11,9
Índice de polidispersão	$2,25 \pm 0,335$	$2,38 \pm 0,403$	$2,19 \pm 0,327$	$2,10 \pm 0,112$	$2,79 \pm 0,179$

Para os valores de pH que se encontram neste intervalo tal já não acontece, sendo o PI de todas as amostras sempre inferior a 0,7 – ver Tabela 3-9. Contudo, e ainda assim, é notória a presença de grandes agregados em todas elas.

Tabela 3-9 Índice de polidispersão das soluções com pH 6,6; 7,2; 7,4; 8,3 e 10,1

	6,6	7,2	7,4	8,3	10,1
PI	$0,445 \pm 0,0181$	$0,410 \pm 0,0568$	$0,426 \pm 0,0171$	$0,667 \pm 0,0276$	$0,439 \pm 0,0326$

Os valores dos respetivos diâmetros hidrodinâmicos, os quais não contabilizam os grandes agregados, bem como o valor do potencial zeta, ambos em função do pH, encontram-se na Fig. 3-9.

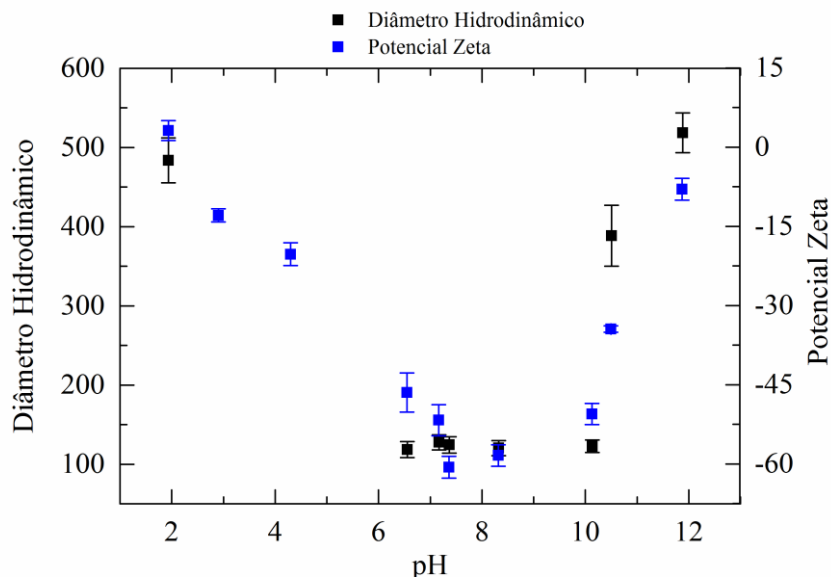


Fig. 3-9 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta em função do pH para NPs Fe_3O_4 AO 64%, para uma concentração de ferro de 33,5 mM.

Pela observação da Fig. 3-9, é possível verificar que, para os valores de pH entre 6,6 e 10,1, o potencial zeta das nanopartículas situa-se nitidamente abaixo de -30 mV, pelo que estas se encontram estáveis. Tal justifica-se uma vez que o ácido oleico apresenta um pK_a de 4,8 [58] e, como tal, para um pH acima deste valor é favorecida a desprotonação do seu grupo carboxilo, o que facilita a sua ligação à superfície das NPs, uma vez que é através do grupo COO^- que esta ligação ocorre [59]. Além disso, o pK_a do grupo hidroxilo, presente na superfície das nanopartículas, apresenta um valor de 10,3 [60], facto que pode justificar a instabilidade das nanopartículas para valores superiores a 10,1.

Ainda neste intervalo de pH entre 6,6 e 10,1, constata-se que o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas é independente do pH, apresentando um valor que ronda os 120 nm. Por outro lado, e tal como já era expectável pelo que se concluiu da análise da Fig. 3-8, para valores fora deste intervalo o potencial zeta das nanopartículas aumenta para valores que refletem a sua instabilidade, tornando-se também visível o aumento do tamanho hidrodinâmico das mesmas. Realce-se, ainda, o facto de a gama de pH em que as nanopartículas se encontram estáveis incluir o pH 7, o que indica que as mesmas podem ser utilizadas em meio fisiológico.

Além disso, estão também concordantes com os valores apresentados por Velusamy *et al.* [7], os quais sintetizaram nanopartículas de óxido de ferro, tendo modificado a superfície da mesma com ácido oleico. De facto, para valores de pH de 3, 5, 7 e 9, obtiveram um potencial zeta de -2.5, -26.5, -40 e -55 mV, respetivamente.

3.5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

De forma a compreender o mecanismo de acoplamento entre o ácido oleico e a superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 previamente sintetizadas, foram realizadas medições de FTIR. As Fig. 3-10 e Fig. 3-11 mostram o espectro do ácido oleico puro, tirado da base de dados NIST, e das nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com diferentes quantidades deste tensioativo, respetivamente.

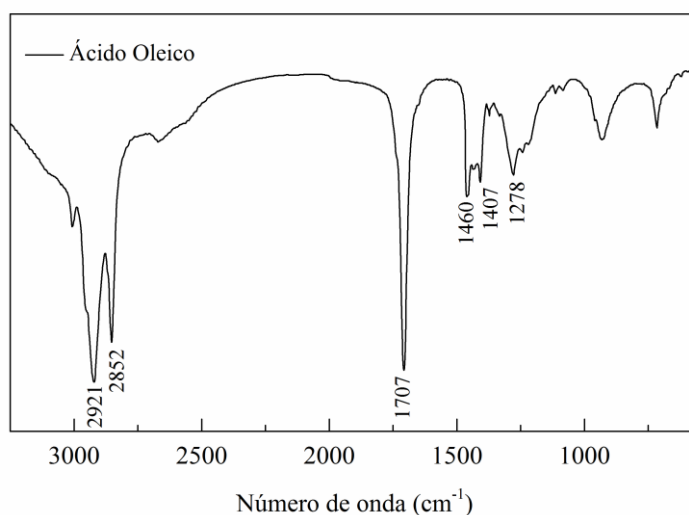


Fig. 3-10 Espectro de FTIR do ácido oleico.

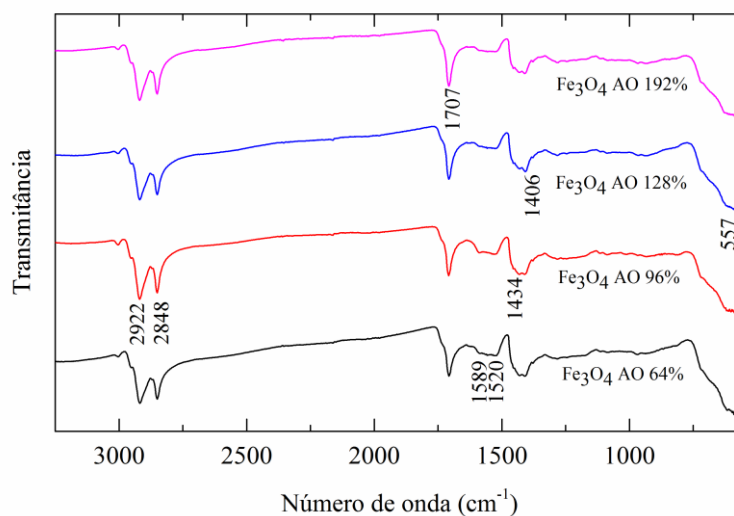


Fig. 3-11 Espectro de FTIR das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

As bandas correspondentes aos números de onda 557 cm^{-1} e 1589 cm^{-1} na Fig.3-11 são características das moléculas de Fe_3O_4 e representam, respectivamente, o modo de vibração da ligação Fe-O e o modo de vibração da ligação O-H estando, por isso, presentes nos quatro espectros [32].

As vibrações simétricas e assimétricas da ligação CH_2 presentes no espectro do ácido oleico (bandas 2921 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} na Fig. 3-10), estão também presentes nas NPs revestidas com diferentes quantidades de AO (bandas a 2922 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} na Fig. 3-11), confirmando, assim, a presença destes grupos [59]. Já a ligação do CH_3 nesta mesma molécula é comprovada pelas bandas 1407 cm^{-1} na Fig. 3-10 e 1406 cm^{-1} na Fig. 3-11 [32].

Yang *et al.* [33] analisaram os espectros de FTIR de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com 17% e 50% de ácido oleico em relação à massa das mesmas. Através do estudo comparativo que realizaram observaram que a banda a 1710 cm^{-1} , característico da ligação C=O do grupo carbonilo, estava ausente no espectro das nanopartículas com menor concentração de ácido oleico. No entanto, a mesma surgia no espectro correspondente às nanopartículas com 50% deste tensioativo. Sabendo que a concentração mínima necessária para criar uma dupla camada de ácido oleico ligada à superfície das nanopartículas de óxido de ferro é de 20%, os investigadores concluíram que a banda a 1710 cm^{-1} advém da presença de uma bicamada. Deste modo, e uma vez que a banda a 1707 cm^{-1} está presente nos espectros apresentados na Fig. 3-11 comprova-se a presença de uma bicamada de ácido oleico ligada às nanopartículas sintetizadas.

Por fim, as bandas 1520 cm^{-1} e 1435 cm^{-1} presentes na Fig. 3-11 correspondem, respetivamente, às vibrações simétrica e antissimétrica do $-\text{COO}^-$ e garantem que o ácido oleico está quimicamente ligado à superfície das NPs de Fe_3O_4 pelo grupo carboxilato [35]. Desta forma, o padrão de ligação do ácido carboxílico na superfície das NPs é uma combinação de moléculas ligadas simetricamente e ligadas com um determinado ângulo à superfície das NPs [59].

O tipo de interação entre este e os átomos de metais pode ser definido pela diferença do número de onda, Δ , das vibrações simétrica e antissimétrica do $-\text{COO}^-$, podendo ser de quatro tipos: ligação monodentada ($200\text{-}320\text{ cm}^{-1}$); ligação bidentada ($140\text{-}190\text{ cm}^{-1}$); ligação quelante-bidentada ($<110\text{ cm}^{-1}$) e ligação iónica [61]. Neste caso (85 cm^{-1}) constata-se que a ligação é do tipo quelante-bidentada.

Realce-se ainda que, pela análise de todos os espectros da Fig. 3-11 é possível constatar que, para as concentrações de ácido oleico consideradas, não parece haver diferenças significativas nas ligações existentes entre este e as nanopartículas de Fe_3O_4 , já que apresentam bandas com números de onda semelhantes.

3.5.5. Análise Termogravimétrica

Com o intuito de se comprovar a presença de ácido oleico a revestir as nanopartículas de Fe_3O_4 , as mesmas foram também sujeitas a uma análise térmica. A Fig. 3-12 a) e b) apresenta as curvas de TGA – as quais representam a perda de massa de uma determinada amostra com o aumento da temperatura – das nanopartículas de Fe_3O_4 com diferentes concentrações de ácido oleico e as respectivas curvas de DTA – as quais refletem os picos derivativos das perdas de massa nas curvas de TGA.

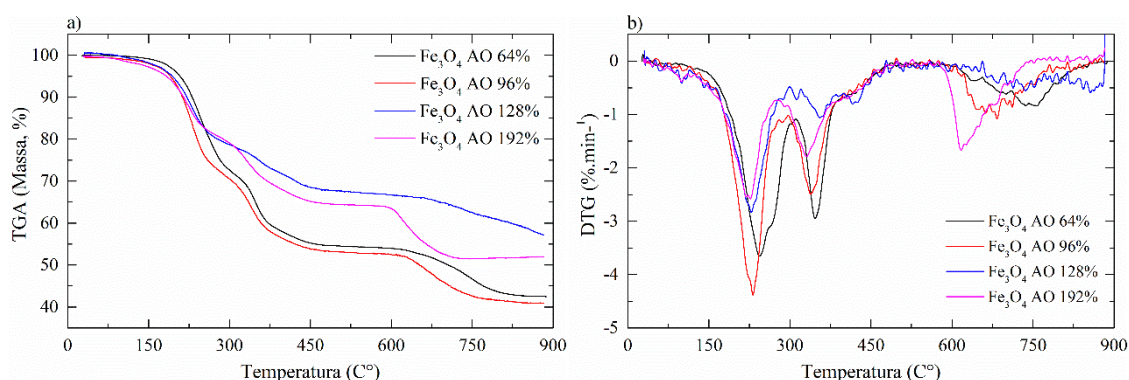


Fig. 3-12 Curvas TGA (a) e DTA (b) das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

Pela observação da Fig. 3-12 b) é possível constatar que todas as amostras apresentam três picos derivativos na curva de DTA. Os respectivos valores, bem como as perdas de massa correspondentes, encontram-se sumariados na Tabela 3-10.

Tabela 3-10 Picos derivativos e perdas de massa das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

Amostra	1ª perda de massa		2ª perda de massa		3ª perda de massa		Total de perda de massa (%)
	Pico derivativo (°C)	Perda de massa (%)	Pico derivativo (°C)	Perda de massa (%)	Pico derivativo (°C)	Perda de massa (%)	
Fe_3O_4 AO 64%	244	26,5	347	17,4	800	13,4	57,3
Fe_3O_4 AO 96%	232	27,4	339	16,7	684	10,9	54,9
Fe_3O_4 AO 128%	229	19,6	354	10,1	736	7,86	37,6
Fe_3O_4 AO 192%	228	19,7	330	13,9	615	12,7	46,3

O primeiro pico derivativo é atribuído às moléculas de ácido oleico que se encontram livres nas amostras. Já o segundo pico corresponde ao ácido oleico que está efetivamente ligado às nanopartículas e ocorre quando uma bicamada está presente [62], corroborando os resultados de FTIR. Relativamente ao terceiro pico, poder-se-ia considerar a hipótese de este também ser atribuído ao ácido oleico, tal como sugeriu Lan *et al.* [63]. No seu estudo, o qual também envolveu a síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com uma bicamada de ácido oleico, e através da análise termogravimétrica que realizou às mesmas, constataram a presença de apenas duas perdas de massa, as quais se situavam entre os 300°C e os 700°C . Na discussão de resultados que apresentam associam o primeiro patamar à camada externa da bicamada de ácido oleico e o segundo à camada mais interna. Contudo, os resultados de Yang *et al.* [33] refutam tal teoria. De facto, o TGA que realizaram às nanopartículas de Fe_3O_4 com 50% de AO que sintetizaram revelou a existência de três perdas de massa, as quais correspondem aos picos derivativos 208°C , 344°C e 672°C , o que vai ao encontro dos resultados obtidos no âmbito do presente estudo. Contudo, constataram que, se o terceiro pico fosse também derivado do AO, este apresentaria uma perda de massa total de 60%, o que seria impossível. Assim sendo, propuseram que este poderia ser atribuído à redução das nanopartículas de Fe_3O_4 , provocada pelos gases redutores advindos da degradação do ácido oleico. Desta forma, consideram, portanto, que a perda de massa entre os 600°C aos 750°C pode advir da perda de massa das próprias nanopartículas.

3.5.6. Microscopia Eletrónica de Transmissão

Com o intuito de se averiguar o efeito de diferentes concentrações de ácido oleico no diâmetro das nanopartículas e no seu estado de agregação, as mesmas foram submetidas a uma análise por TEM, a qual foi realizada para uma mesma concentração de ferro nas quatro amostras. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Fig. 3-13, Fig. 3-14, Fig. 3-15 e Fig. 3-16.

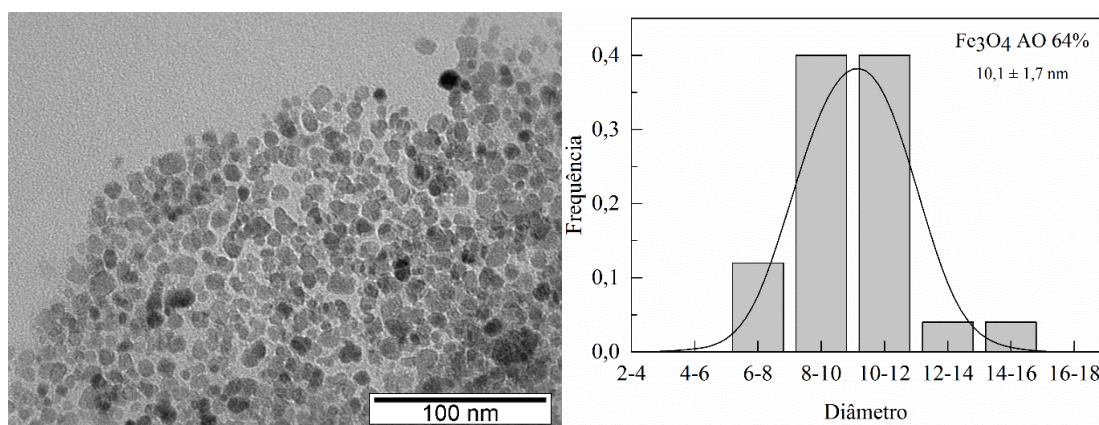


Fig. 3-13 Imagem obtida por TEM de NPs Fe_3O_4 AO 64% e respetivo gráfico de distribuição de tamanhos.

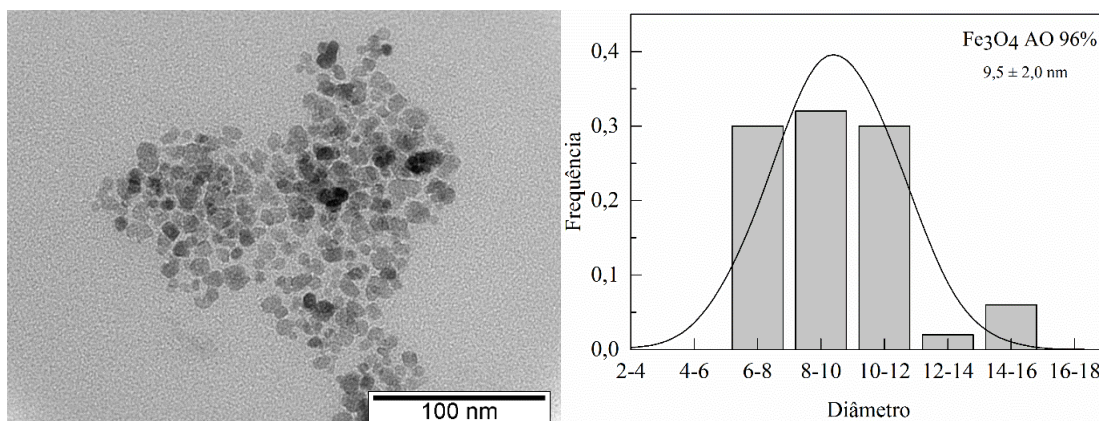


Fig. 3-14 Imagem obtida por TEM de NPs Fe₃O₄ AO 96% e respectivo gráfico de distribuição de tamanhos.

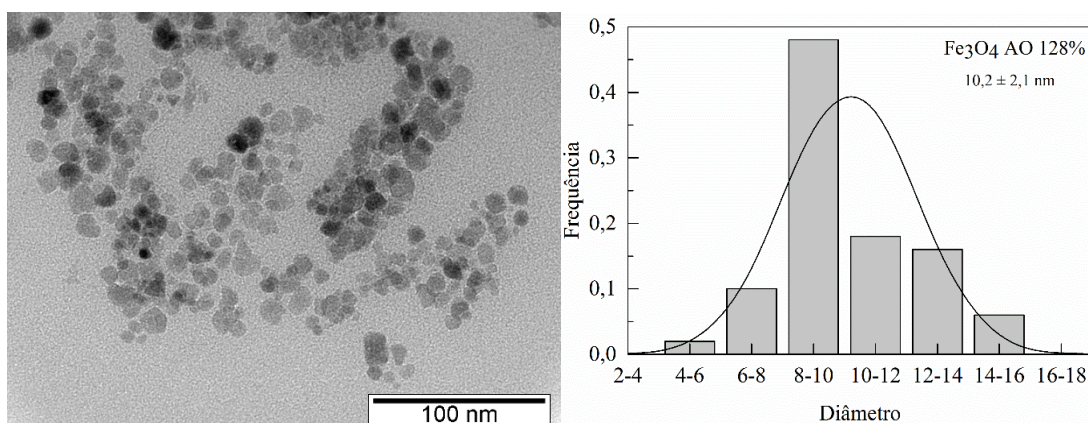


Fig. 3-15 Imagem obtida por TEM de NPs Fe₃O₄ AO 128% e respectivo gráfico de distribuição de tamanhos.

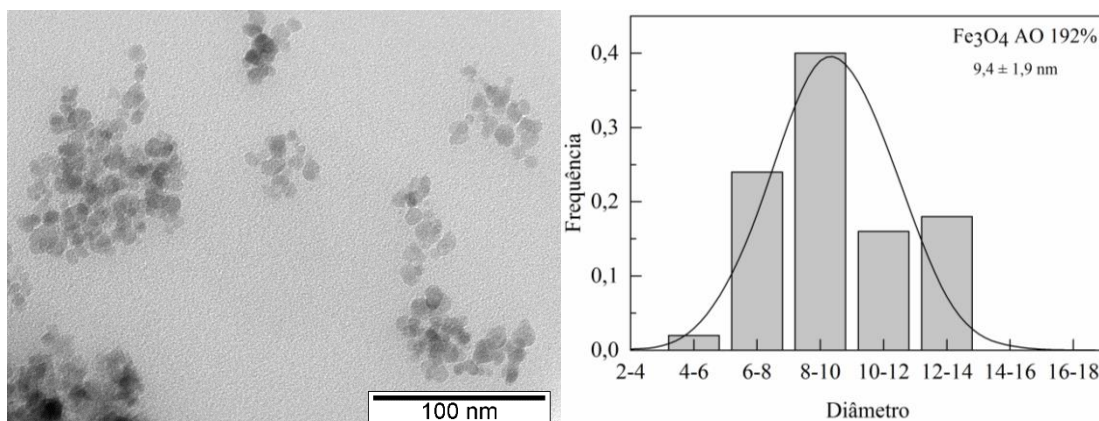


Fig. 3-16 Imagem obtida por TEM de NPs Fe₃O₄ AO 192% e respectivo gráfico de distribuição de tamanhos.

Para que as nanopartículas possam ser utilizadas em aplicações biomédicas, o diâmetro do seu núcleo não deve ser superior a 100 nm [35]. Além disso, sabe-se ainda que núcleos de nanopartículas de óxido de ferro cujo diâmetro ultrapassa os 20 nm deixam de apresentar

propriedades superparamagnéticas [37]. Neste contexto, as nanopartículas sintetizadas mostram-se promissoras, já que apresentam um diâmetro observado em TEM que ronda os 10 nm.

Pela análise dos resultados apresentados pode-se ainda aferir que a concentração de ácido oleico não afeta o diâmetro das nanopartículas, mas altera, no entanto, o estado de agregação das mesmas. De facto, é possível verificar-se que, à medida que a concentração do tensioativo aumenta, o estado de agregação das mesmas diminui consideravelmente, uma vez que o ácido oleico diminui a interação entre as nanopartículas – interação dipolo-dipolo – aumentando, consequentemente, a dispersão das mesmas [64].

Comparando os diâmetros hidrodinâmicos calculados por DLS e o tamanho médio das nanopartículas obtidos por TEM – os quais não contabilizam a espessura do revestimento –, é notória a discordância entre os resultados adquiridos por ambas as técnicas. De facto, e mesmo considerando que a espessura da camada de ácido oleico é de cerca de 2 nm [48] e a presença de uma bicamada deste ligada às nanopartículas, existe uma discrepância de uma ordem de magnitude entre as duas experiências. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de o método de síntese (precipitação química) não produzir partículas estáveis, o que permite que estas agreguem ainda antes da adição do tensioativo. Desta forma, o ácido oleico irá formar uma bicamada à volta de agregados de nanopartículas de Fe_3O_4 e não de partículas individualizadas, originando um diâmetro hidrodinâmico na ordem dos 150 nm, aproximadamente [35].

3.5.7. Difração por Raios-X

Com o intuito de se aferir acerca da estrutura das nanopartículas sintetizadas, efetuou-se uma análise por DRX às nanopartículas revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico, cujos padrões de DRX se encontram na Fig. 3-17. Apresenta-se ainda, na Fig. 3-18, o padrão de DRX das nanopartículas sem qualquer revestimento – sintetizadas segundo o mesmo protocolo utilizado para as NPs em estudo – retiradas de [43], de modo a facilitar a comparação entre os diversos padrões representados.

O padrão de DRX correspondente às NPs sem revestimento apresenta seis picos, situados em 2θ igual a 30,1; 35,5; 43,2; 53,5; 57,0; 62,8, os quais correspondem aos planos de difração (220), (311), (400), (422), (511) e (440), respetivamente. A posição dos picos coincide quase totalmente com os apresentados em JCPDS 00-019-0629 para a magnetite, pelo que as nanopartículas possuem uma estrutura cúbica cristalina [7]. Além disso, o padrão de DRX das NPs não apresenta planos de rede característicos da magmiste [(210), (300), (320)], o que implica que a mesma não está presente [7].

Uma vez que os picos observados nas nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de ácido oleico se sobrepõem quase totalmente aos das NPs sem revestimento (30,2; 35,6; 43,3; 53,5; 57,2; 62,9), conclui-se que o ácido oleico não altera a estrutura cristalina das NPs Fe_3O_4 .

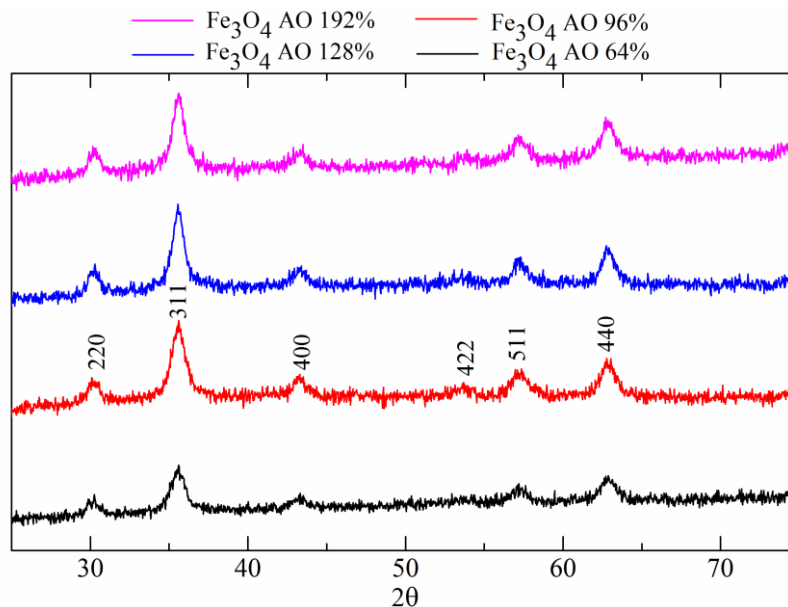


Fig. 3-17 Padrões de DRX das nanopartículas sintetizadas com diferentes concentrações de ácido oleico.

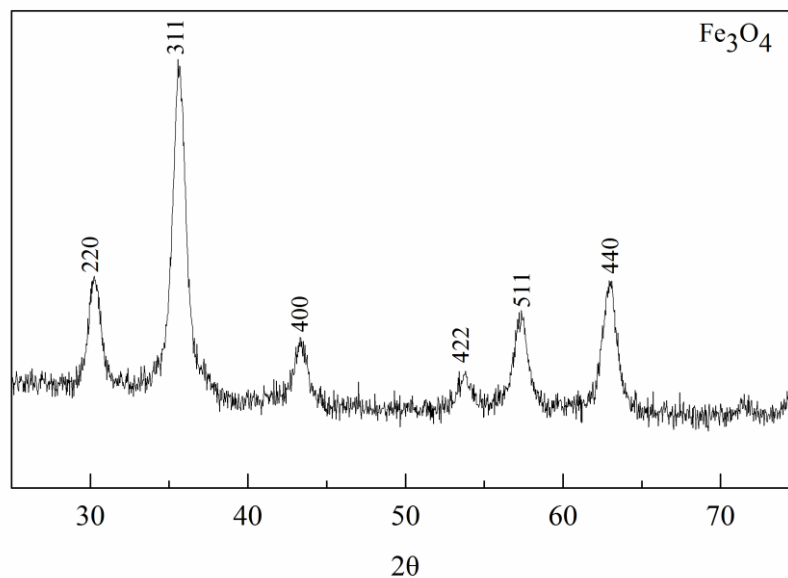


Fig. 3-18 Padrões de DRX das nanopartículas de Fe_3O_4 sem revestimento.

Contudo, ocorre uma perda de intensidade dos picos das nanopartículas com revestimento, o que pode indicar alguma perda de cristalinidade [35].

O diâmetro médio do cristalito, D , das nanopartículas foi calculado através da equação de *Scherrer*, dada por:

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Eq. 3-3}$$

Onde k representa uma constante que depende da forma das partículas (0,94), λ o comprimento de onda da radiação incidente, β a largura a meia altura do pico mais intenso (em radianos) – θ [65].

Através desta, chegou-se aos valores de 11,9 nm; 9,5 nm; 10,7 nm e 11,1 nm para as nanopartículas Fe₃O₄ AO 64%, Fe₃O₄ AO 96%, Fe₃O₄ AO 128% e Fe₃O₄ AO 196%, respetivamente. Estes resultados, apesar de ligeiramente superiores aos verificados por TEM, situam-se no intervalo definido pelo desvio-padrão em relação à média dos tamanhos das nanopartículas obtidas por esta técnica.

Relaxometria por RMN, IRM e Citotoxicidade

Neste capítulo apresentam-se os equipamentos e parâmetros utilizados para a caracterização das nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas, no que respeita a estudos de relaxometria por ressonância magnética nuclear e ao seu efeito como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética nuclear bem como os procedimentos necessários aos ensaios de citotoxicidade. Termina-se com a análise e discussão dos resultados advindos das referidas caracterizações e procedimentos.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Relaxometria por RMN

A partir das amostras de nanopartículas de óxido de ferro com diferentes concentrações de ácido oleico – 64%, 96%, 128% e 192% – previamente sintetizadas, e para cada uma delas, foram preparadas soluções aquosas cuja gama de concentração de ferro se encontra entre 3,2 e 0,4 mM.

As medidas dos tempos de relaxação longitudinal e transversal de cada amostra foram adquiridas no espectrómetro *Bruker Avance III 7.2 T*, a 36°C, temperatura corporal, através das sequências de pulso *inversion-recovery* e *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*, respetivamente, tendo sido utilizada a sonda de líquidos $^{13}\text{C}/^1\text{H}/^2\text{H}$ 5 mm dual probe (VT).

4.1.2. Imagem por RMN

Para a aquisição de imagem e para cada tipo NPs Fe_3O_4 com diferentes concentrações de ácido oleico – 64%, 96%, 128% e 192% –, foram preparadas soluções aquosas de nanopartículas, com uma concentração de ferro entre 3,2 e 0,4 mM, com agar 0,5% (m/m).

As imagens destas soluções foram adquiridas no espectrómetro *Bruker Avance III 7.2 T* equipado com uma unidade de gradientes GRASP IIP e amplificadores de alta potência (60A – 1500G/cm),

através da sonda de imagem *PH Micro 2.5* com um *insert* de ^1H . As imagens foram adquiridas a 36°C , temperatura corporal.

As imagens obtidas para as NPs com 64% e 96% de AO foram obtidas através de uma sequência MSME (do inglês *multislice-multiecho*), com um tempo de repetição de 5000 ms, tempo de eco de 4,7 ms, *flip angle* de 180° , campo de visão de 1,8 cm, matriz de 256x256 e com um tempo de aquisição de 1h 25min 20s. Já imagens das nanopartículas com 128% e 192% de AO foram adquiridas com a sequência FLASH (do inglês *fast low angle shot*), com o mesmo tempo de repetição, campo de visão e matriz que as anteriores, mas com um tempo de eco de 2,9 ms, *flip angle* de 30° e tempo de aquisição de 2 h 50 min 40 s.

4.1.3. Citotoxicidade

De forma a averiguar a viabilidade celular aquando do contacto das células com as NPs Fe_3O_4 com as diferentes concentrações de AO previamente sintetizadas, foram efetuados ensaios de citotoxicidade em células Vero (células do rim do tipo fibroblasto), através do teste da resazurina. De seguida explica-se, de forma sucinta, o procedimento executado.

4.1.3.1. Procedimento

A 1 mL do meio celular adicionaram-se 4 mL de meio de cultura (Meio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal), tendo-se transferido a solução total para um frasco de cultura celular T25, o qual foi incubado a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 , durante a noite.

No dia seguinte, removeu-se o meio do frasco, tendo-se procedido a uma lavagem do mesmo com PBS 1X, sem cálcio nem magnésio. Posteriormente, acrescentaram-se 500 μL de Tripsina e incubou-se durante 5 min. Findo este período de tempo, adicionou-se novo meio de cultura e procedeu-se à contagem das células no microscópio. Seguidamente, para uma placa de 96 poços pipetaram-se, para cada um deles, 100 μL da solução presente no frasco T25, o que corresponde a 5000 células por poço. Por fim, colocou-se a placa na incubadora durante 24 h.

Subsequentemente, diluíram-se as NPs em meio celular com 1% de antifúngico, de forma a obter uma gama de concentrações de ferro entre 12,53 mM e 0,10 mM. Posteriormente, removeu-se o conteúdo dos mesmos e pipetou-se 100 μL da solução de NPs para cada um. Por fim, incubou-se, novamente, a placa por um período de 24 h.

Para a determinação da viabilidade celular pelo método da resazurina, procedeu-se à aspiração dos poços e a uma nova lavagem dos mesmos, desta vez com PBS contendo cálcio e magnésio, de forma a remover a totalidade das NPs. De seguida, adicionaram-se 100 μL de meio com 10%

de resazurina a cada poço e, findo um período de incubação da placa de 2 h, procedeu-se à medição da absorvância do meio contido nos poços a 570 e a 600 nm.

As células controlo foram mantidas nas mesmas condições do que as células testadas, sem a adição de nanopartículas.

4.2. Análise e Discussão de Resultados

4.2.1. Relaxometria por RMN

Foram medidos os tempos de relaxação longitudinal e transversal das moléculas de água aquando do contacto com as nanopartículas de óxido de ferro revestidas com diferentes concentrações de ácido oleico, a diferentes concentrações de ferro. Estes permitiram a construção dos gráficos da taxa de relaxação longitudinal (Fig. 4-1) e transversal (Fig. 4-2) em função da concentração de ferro, os quais se apresentam de seguida. Realce-se que cada valor representa a média de três medições, estando o desvio padrão de cada experiência também representado nos gráficos.

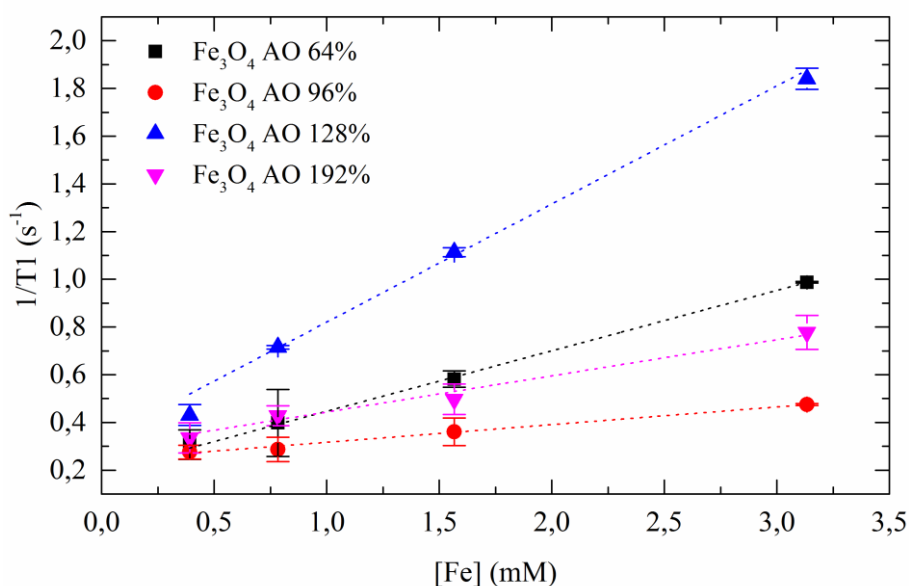


Fig. 4-1 Taxa de relaxação longitudinal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

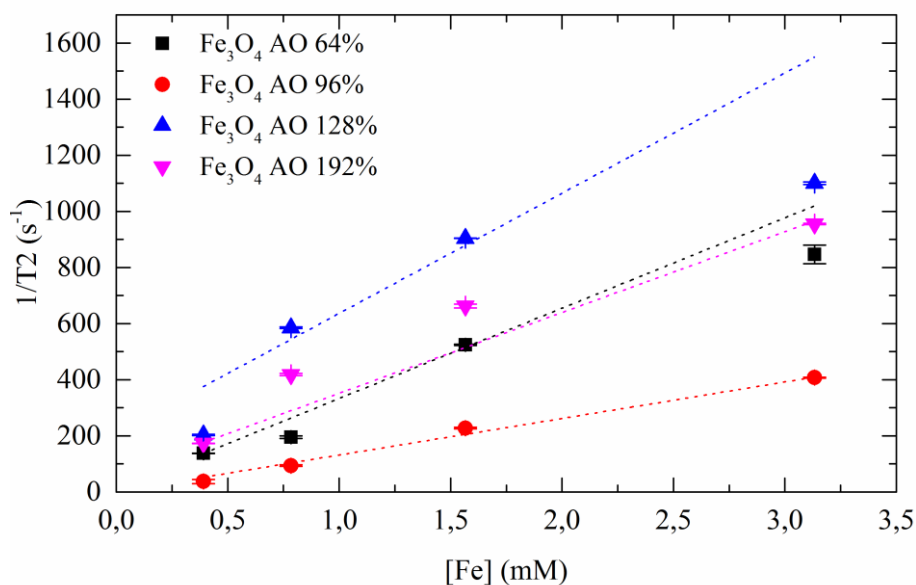


Fig. 4-2 Taxa de relaxação transversal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

As relaxividades longitudinal e transversal, dadas pelos declives das retas obtidas (ver Eq. 2.6), encontram-se na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 Relaxividade longitudinal e transversal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico.

Amostra	r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$)	R^2	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$)	R^2
Fe_3O_4 AO 64%	0,253	0,999	322	0,985
Fe_3O_4 AO 96%	0,074	0,998	130	0,991
Fe_3O_4 AO 128%	0,495	0,992	428	0,731
Fe_3O_4 AO 192%	0,152	0,968	288	0,982

De acordo com o artigo [66], os aglomerados modificam tanto a relaxação longitudinal como a transversal, ainda que de maneira muito distinta. De facto, e ainda de acordo com este, os efeitos provenientes da agregação das nanopartículas advêm de dois fatores: por um lado, aqueles limitados à parte interna do agregado e, por outro, aqueles relacionados com a estrutura global do mesmo e com a distribuição do campo magnético ao seu redor. Enquanto os primeiros afetam, essencialmente, o tempo de relaxação longitudinal, os segundos relacionam-se com o tempo de relaxação transversal. A agregação aumenta o tempo de residência da água no interior do agregado, o que diminui r_1 [67]. Por outro lado, a aglomeração aumenta a relaxividade transversal,

uma vez que os agregados são vistos como uma única partícula magnética. Desta forma, o momento magnético total aumenta e, conseqüentemente, as variações do campo sentidas pelos prótons de água são maiores, pelo que estes relaxam mais rapidamente [66].

Dado o exposto, e atendendo aos resultados observados a partir das imagens recolhidas por TEM, seria de esperar que a relaxividade longitudinal aumentasse com o aumento da concentração de ácido oleico, uma vez que este leva a um menor estado de agregação das NPs. Pelo contrário, seria expectável que o aumento da concentração de ácido oleico conduzisse a uma diminuição da relaxividade transversal. Contudo, e tal como se constata pela análise da tabela anterior, tal não se verifica.

Uma possível justificação para tal facto pode advir do ocorrido após a síntese das nanopartículas.

Relembrem-se as situações A e B já explicadas em 3.5.1.

- Em relação à situação A, a concentração de nanopartículas de óxido de ferro é semelhante entre Fe_3O_4 AO 64% e Fe_3O_4 AO 96%, por um lado, e entre Fe_3O_4 AO 128% e Fe_3O_4 AO 192% por outro, variando a concentração de ácido oleico.
- Relativamente à situação B, a concentração de ácido oleico é similar (entre Fe_3O_4 AO 64% e Fe_3O_4 AO 128%, por um lado, e entre Fe_3O_4 AO 96% e Fe_3O_4 AO 192%, por outro), alterando concentração de nanopartículas de óxido de ferro.

No que concerne à situação A, foque-se o par Fe_3O_4 AO 64% e Fe_3O_4 AO 96%, que contêm aproximadamente a mesma concentração de NPs, variando a concentração de AO. O aumento da concentração de ácido oleico em solução pode dificultar a aproximação das moléculas de água às nanopartículas, o que diminui a relaxividade [14] – ver Fig. 4-3. Tal facto pode justificar, no presente estudo, uma menor relaxividade das nanopartículas Fe_3O_4 AO 96% quando comparadas com as Fe_3O_4 AO 64%. Além disso, de acordo com [66], para uma concentração superior à concentração micelar crítica, as moléculas de ácido oleico tendem a agregar. A configuração e tamanho dos agregados formados em solução varia à medida que aumenta a concentração do ácido oleico. No estudo que apresentam, por exemplo, numa concentração de 15 mM, o ácido oleico tende a formar micelas e a 30 mM vesículas, sendo que estas últimas possuem um tamanho superior às primeiras.

Tais factos podem também explicar uma menor relaxividade das nanopartículas Fe_3O_4 AO 96% em relação às Fe_3O_4 AO 64%, uma vez que as configurações e a dimensão dos agregados formados pelo ácido oleico podem, mais uma vez, dificultar a aproximação das moléculas de água às nanopartículas.

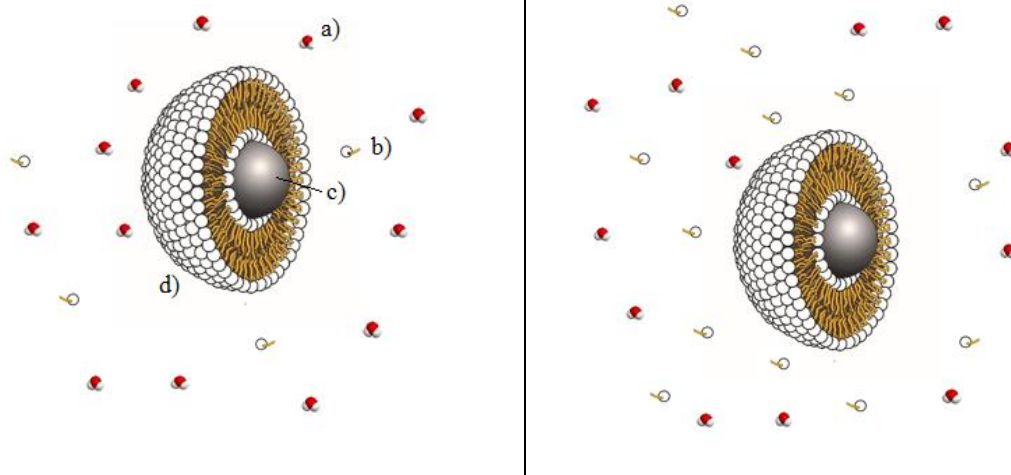


Fig. 4-3 Esquema ilustrativo do efeito da concentração de ácido oleico na aproximação das moléculas de água à superfície da nanopartícula. À esquerda | direita, uma menor | maior concentração de ácido oleico possibilita uma maior | menor aproximação das moléculas de água à superfície da nanopartícula. a) Molécula de água; b) molécula de ácido oleico; c) nanopartícula revestida; d) bicamada de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala. Adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lipossoma>; <http://chc.org.br/curiosidades-aquaticas/>.

Retomando o exemplo anterior, a configuração das vesículas, ao apresentar uma maior área superficial, potencia o aumento das ligações com as moléculas de água presentes em solução. Tal dificultaria a sua difusão e, conseqüentemente, a sua interação com as nanopartículas [68].

A Fig. 4-4 Pretende ilustrar uma possível ocorrência do exposto.

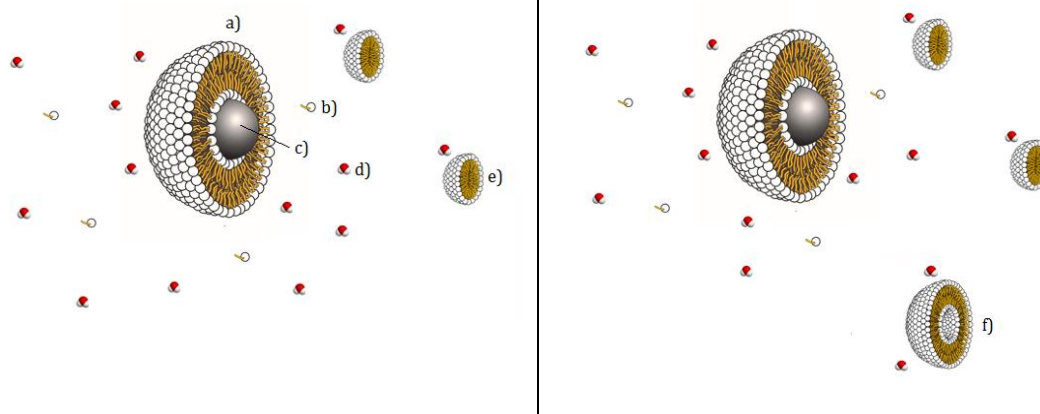


Fig. 4-4 Representação esquemática do efeito de uma vesícula na diminuição da interação entre as moléculas de água e a nanopartícula. Na figura à esquerda retrata-se uma possível situação para as nanopartículas Fe_3O_4 AO 64% e à direita para Fe_3O_4 AO 96%. a) Bicamada de ácido oleico; b) molécula de ácido oleico; c) nanopartícula revestida; d) molécula de água; e) micela de ácido oleico; f) vesícula de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala. Adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lipossoma>; <http://chc.org.br/curiosidades-aquaticas/>.

Realce-se que o que se constatou para este par replica-se para o par Fe_3O_4 AO 128% e Fe_3O_4 AO 192%.

No que diz respeito à situação B, destaque-se o par Fe_3O_4 AO 64% e Fe_3O_4 AO 128%, em que a concentração de ácido oleico em solução é semelhante, mas a concentração de nanopartículas é diferente. Partindo das soluções iniciais, as nanopartículas Fe_3O_4 AO 64% apresentam-se mais agregadas do que as revestidas com 128% de ácido oleico, uma vez que as primeiras apresentam uma maior concentração de nanopartículas para uma mesma concentração de ácido oleico – ver Fig. 4-5.

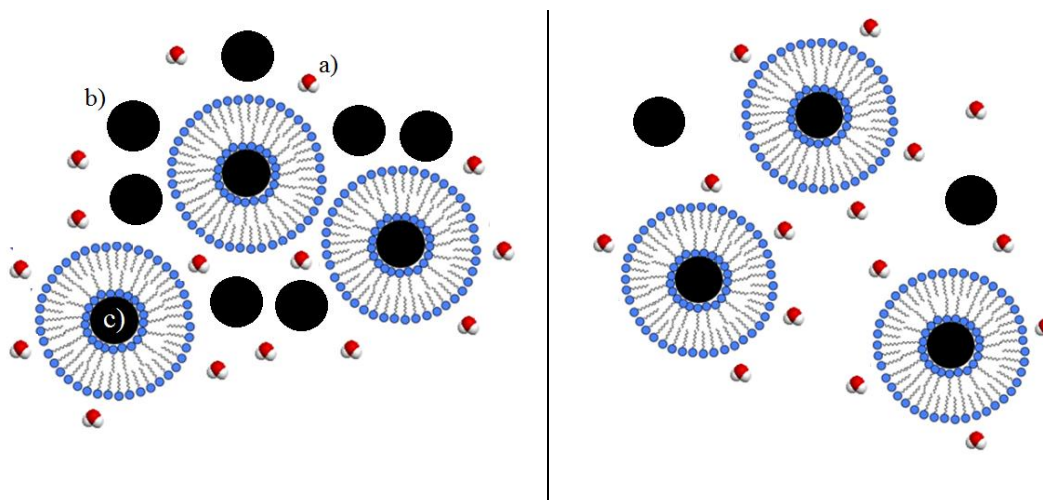


Fig. 4-5 Representação esquemática da influência da concentração de nanopartículas na agregação das mesmas, para uma concentração de ácido oleico constante. À esquerda | direita, um maior | menor concentração de nanopartículas conduz a uma maior | menor agregação das mesmas. a) Molécula de água; b) nanopartículas e c) bicamada de ácido oleico. Nota: o esquema não está feito à escala. Adaptado de <http://icanhasscience.com/bacteria/blinged-out-fat-blob-nanotrucks-for-targeted-drug-delivery/>; <http://chc.org.br/curiosidades-aquaticas/>.

Os resultados obtidos para as relaxações longitudinais no âmbito do presente estudo corroboram a relação entre a agregação e r_1 . No entanto, a relaxividade transversal das nanopartículas Fe_3O_4 AO 128% é superior às revestidas com 64% de ácido oleico. Tal pode advir de uma maior área de superfície de contacto entre as moléculas de água e o revestimento das nanopartículas, diminuindo a difusão das primeiras em torno da superfície das nanopartículas, o que aumenta r_2 [69] – ver Fig. 4-6.

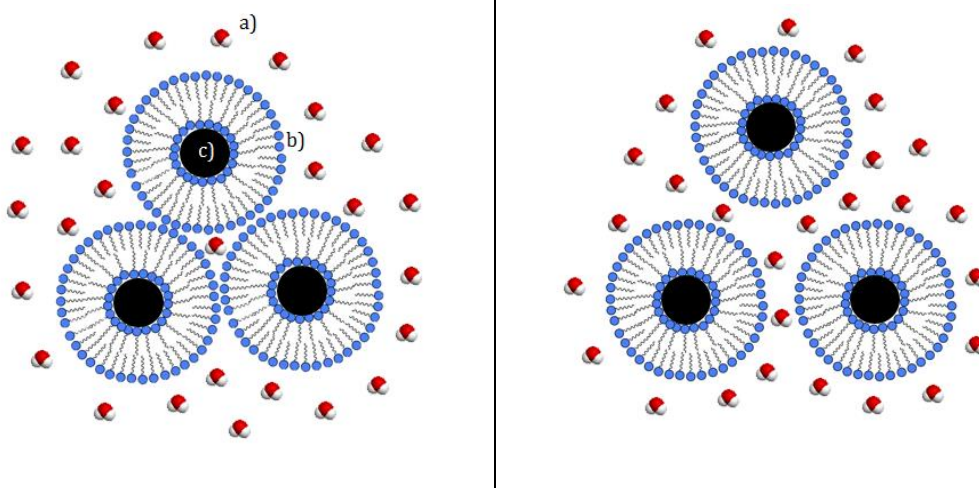


Fig. 4-6 Representação esquemática da influência da interação entre as moléculas de água e as nanopartículas. À esquerda | direita um maior | menor estado de agregação conduz a uma menor | maior interação. a) Molécula de água; b) bicamada de ácido oleico e c) nanopartículas. Nota: o esquema não está feito à escala. Adaptado de <http://icanhasscience.com/bacteria/blinged-out-fat-blob-nanotrucks-for-targeted-drug-delivery/>; <http://chc.org.br/curiosidades-aquaticas/>.

Também se pode dar o caso de, na solução inicial em que havia uma maior concentração de nanopartículas, as moléculas de ácido oleico revestirem um agregado, ao invés de nanopartículas isoladamente – ver Fig. 4-7.

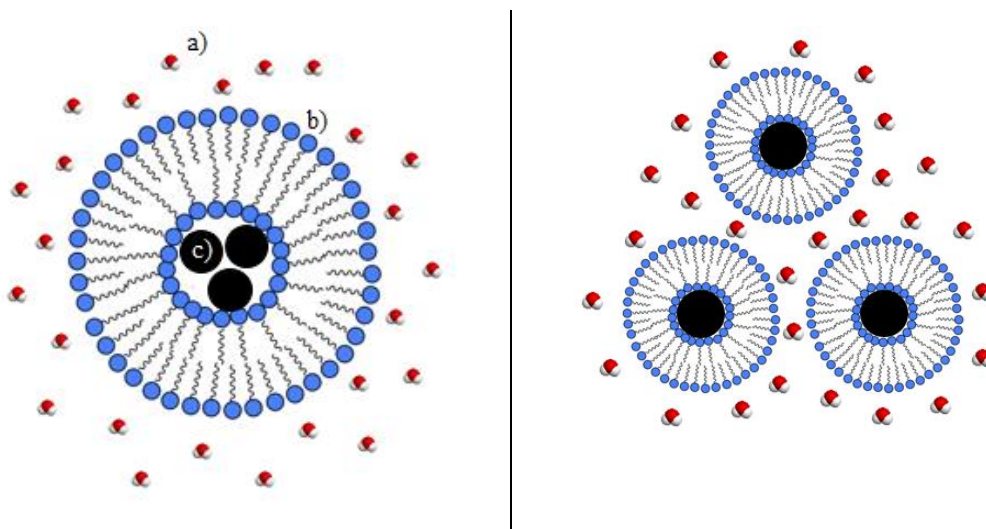


Fig. 4-7 Esquema ilustrativo da interação das moléculas de água com as moléculas de ácido oleico quando as mesmas revestem um agregado de nanopartículas ou nanopartículas isoladamente. À esquerda | direita, uma menor | maior área de superfície de contacto conduz a uma menor | maior interação com as moléculas de água. a) Moléculas de água; b) bicamada de ácido oleico e c) nanopartículas. Nota: o esquema não está feito à escala. Adaptado de <http://icanhasscience.com/bacteria/blinged-out-fat-blob-nanotrucks-for-targeted-drug-delivery/>; <http://chc.org.br/curiosidades-aquaticas/>.

No entanto, também neste caso existe uma maior área de superfície de contacto com a qual as moléculas de água podem interagir quando o ácido oleico reveste as nanopartículas isoladamente, o que se continua a traduzir num maior valor de r_2 . Destaque-se que o que se constatou para este par também se verifica para o par Fe_3O_4 AO 96% e Fe_3O_4 AO 192%.

Tendo em conta estes resultados, parece existir uma relação entre as condições das suspensões iniciais (aquando da adição do ácido oleico) e os efeitos na relaxividade. Assim, pensa-se que a concentração inicial de nanopartículas poderá influenciar o seu estado de agregação (quanto maior a concentração de nanopartículas, maior a probabilidade de se formarem agregados), o que posteriormente irá influenciar a forma como as moléculas de ácido oleico se vão dispor à superfície das NPs (ou dos seus agregados). Por outro lado, a concentração de ácido oleico na solução inicial também poderá influenciar a forma como este vai interagir com as NPs Fe_3O_4 . Para concentrações de ácido oleico menores (por exemplo, 15 mM), as moléculas de ácido oleico livres, ou seja, que não estejam ligadas às NPs, poder-se-ão organizar em micelas. Por outro lado, concentrações mais elevadas de ácido oleico poderão levar à formação tanto de micelas, como de vesículas, pelas moléculas de ácido oleico livre. Sabendo que estas duas estruturas, micelas e vesículas, vão ter diferentes interações com as moléculas de água, a sua existência, assim como a quantidade em que existem, irá influenciar a relaxividade das moléculas de água presentes na amostra. Como tal, as soluções parecem apresentar como que um *efeito de memória* relativamente às condições iniciais.

Uma vez que o efeito que as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas nos tempos de relaxação da água é dependente do campo a que as medições dos mesmos é realizada, a comparação da relaxividade com a de estudos já publicados deve ser efetuada considerando uma mesma intensidade de campo [68]. Assim, comparando os resultados obtidos na presente dissertação com os apresentados em [68], relativos a nanopartículas de óxido de ferro hidrofílicas ($r_1=0,80 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $r_2=50,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), constata-se que os resultados que se obtiveram neste estudo são mais promissores. A maior relaxividade observada poderá prender-se, principalmente, com a diferença do tamanho das nanopartículas em comparação - uma vez que este fator também influencia a eficiência do agente de contraste [70] - já que o das referidas em [68] é de 5 nm, cerca de metade do das sintetizadas na presente investigação.

Contudo, no mesmo artigo [68], os autores fazem referência às relaxividades obtidas para nanopartículas de óxido de ferro revestidas com polietilenoglicol com um tamanho de $\approx 12 \text{ nm}$ ($r_1=0,68$ e $r_2=311$). Ainda assim, o valor das relaxividades transversais obtidas para as nanopartículas Fe_3O_4 AO 64% e 128% é maior (ver Tabela 4-1).

Convém ainda realçar que se verificou uma sedimentação das NPs após o período em que as mesmas estiveram sob a ação do campo magnético, a qual é visível na Fig. 4-8. Tal foi já

verificado anteriormente, sendo que quanto mais prolongada for a exposição das NPs a um campo magnético, mais aparente será o fenómeno de sedimentação devido à agregação das mesmas [71, 72].



Fig. 4-8 Sedimentação das NPs após 9 h sob a ação de um campo magnético.

De acordo com Bradford [73], aumentando a interação magnética através da aplicação de um campo magnético, aumenta-se a agregação de NPs magnéticas devido às alterações nas interações entre as partículas, em competição com repulsões químicas de superfície causadas por forças da dupla camada elétrica.

Esta situação merece um estudo mais aprofundado ao nível das suas implicações. Por exemplo, será necessário averiguar a partir de que momento esta deposição se inicia e a influência disso em contexto *in vivo*. No entanto, esta sedimentação não alterou significativamente os resultados dos tempos de relaxação obtidos numa fase inicial ou final. Acresce que raramente um exame utilizando a técnica de IRM se prolongará por um período tão longo.

4.2.2. Imagem por RMN

Para as várias nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com diversas concentrações de ácido oleico, à medida que a concentração de ferro aumenta, o contraste por elas exibido é maior, ficando a imagem cada vez mais escura – ver Fig. 4-9 a) a d). Este efeito é particularmente visível na imagem correspondente às das NPs Fe_3O_4 AO 96%, já que nas restantes, a partir de uma concentração de ferro de 1,6 mM, o aumento do contraste deixa de ser tão evidente.

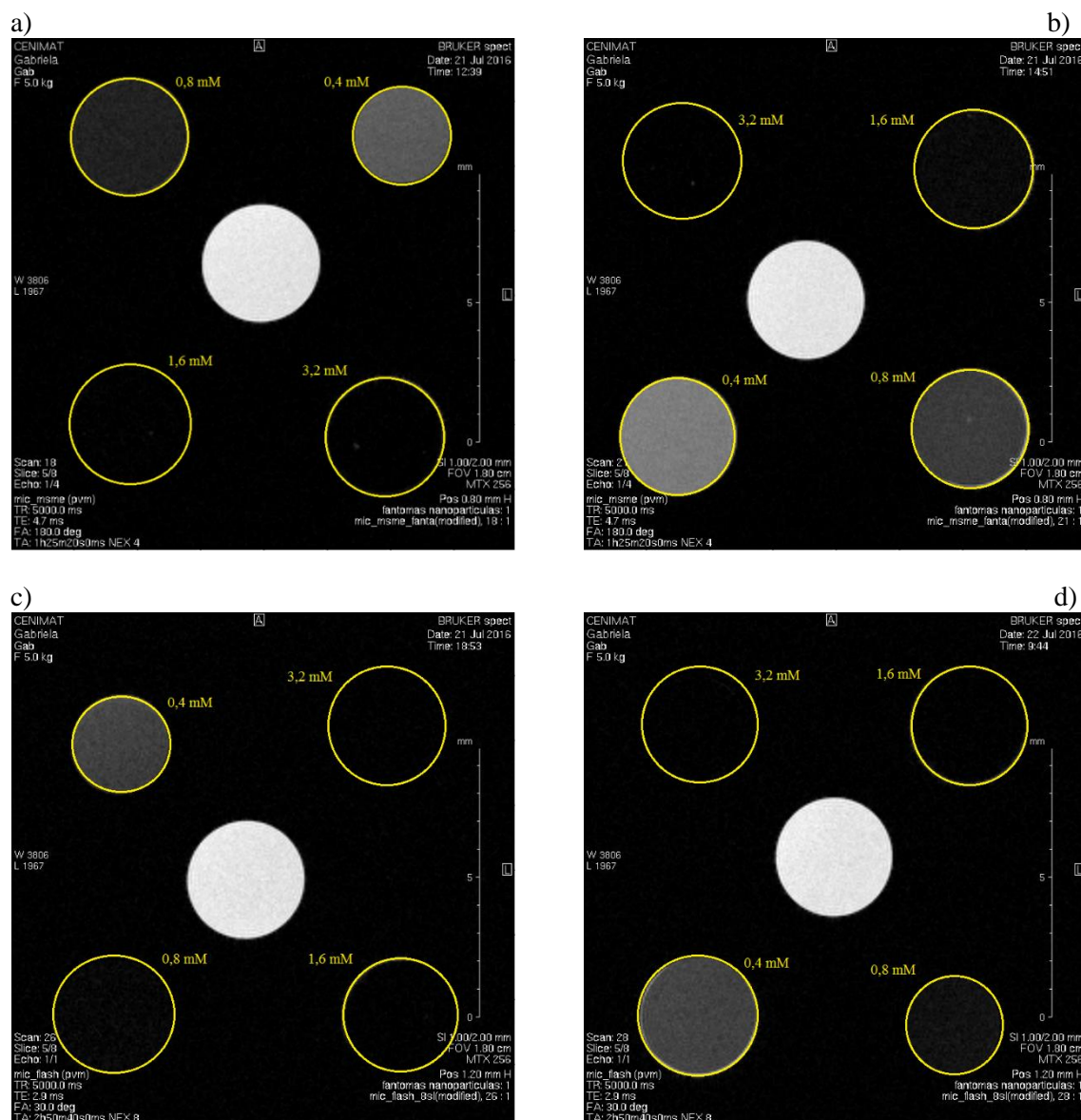


Fig. 4-9 – Efeito no contraste da imagem de NPs Fe_3O_4 AO 64% (a), NPs Fe_3O_4 AO 96% (b), NPs Fe_3O_4 AO 128% (c) e Fe_3O_4 AO 192% (d) para diferentes concentrações de ferro.

Além disso, também se confirma, pelos resultados obtidos nas relaxações transversais, e como se torna explícito pela Fig. 4-10, que as NPs Fe_3O_4 AO 128% são as que apresentam, para a mesma concentração de ferro, maior contraste. Pelo contrário, as NPs Fe_3O_4 AO 96% são as que possuem menor capacidade de gerar contraste.

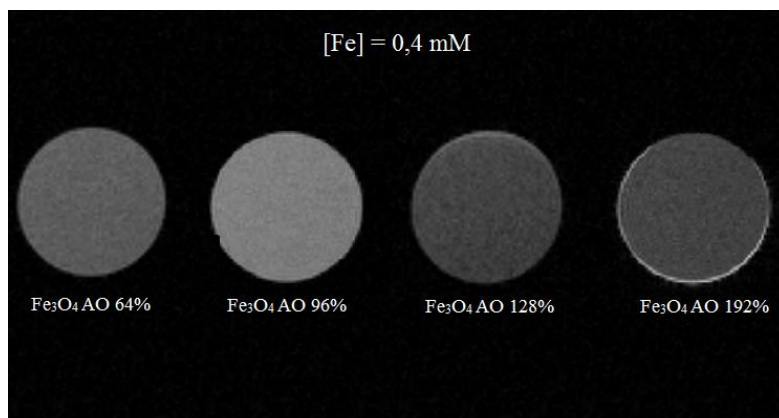


Fig. 4-10 – Contraste da imagem das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico, com uma concentração de ferro de 0,4 mM. A que apresenta menor contraste são as NPs Fe_3O_4 AO 96% e a que apresenta maior são as NPs Fe_3O_4 AO 128%.

Apesar das NPs Fe_3O_4 AO 64% apresentarem uma maior relaxividade transversal (r_2) quando comparadas com as NPs Fe_3O_4 AO 192% (o que pode advir do facto da regressão linear efetuada ponderar os desvios-padrões da média dos resultados obtidos), a taxa de relaxação ($1/T_2$) desta última é sempre superior à taxa de relaxação da primeira – consultar Tabela 4-2. Tal facto justifica o maior contraste na imagem criado pelas NPs Fe_3O_4 AO 192% em relação às revestidas com 64% de ácido oleico.

Tabela 4-2 Taxa de relaxação transversal das NPs Fe_3O_4 revestidas com 64%, 96%, 128% e 192% de ácido oleico para diferentes concentrações de ferro.

[Fe] (mM)	Fe ₃ O ₄ AO 64%		Fe ₃ O ₄ AO 96%		Fe ₃ O ₄ AO 128%		Fe ₃ O ₄ AO 192%	
	R_2 (s ⁻¹)	Desvio Padrão	R_2 (s ⁻¹)	Desvio Padrão	R_2 (s ⁻¹)	Desvio Padrão	R_2 (s ⁻¹)	Desvio Padrão
3,2	847	33,3	408	1,49	1100	4,29	955	2,15
1,6	524	2,28	228	2,93	904	0,668	663	7,35
0,8	196	4,38	94,2	2,64	586	2,90	418	4,00
0,4	138	0,242	37,5	7,47	203	2,13	173	0,647

4.2.3. Citotoxicidade

A toxicidade é uma das características mais importantes no desenvolvimento de um biomaterial. Neste contexto, e com o intuito de averiguar o efeito das diferentes concentrações de ácido oleico que revestem as nanopartículas de Fe_3O_4 em células Vero, foram realizados ensaios de citotoxicidade, tendo as nanopartículas sido colocadas em contacto direto com as mesmas (método direto).

Os resultados encontram-se apresentados na Fig. 4-11, a qual expressa a viabilidade celular, em %, – dada por [(células em contacto com NPs/ células de controlo) x 100] – em função da concentração de ferro.

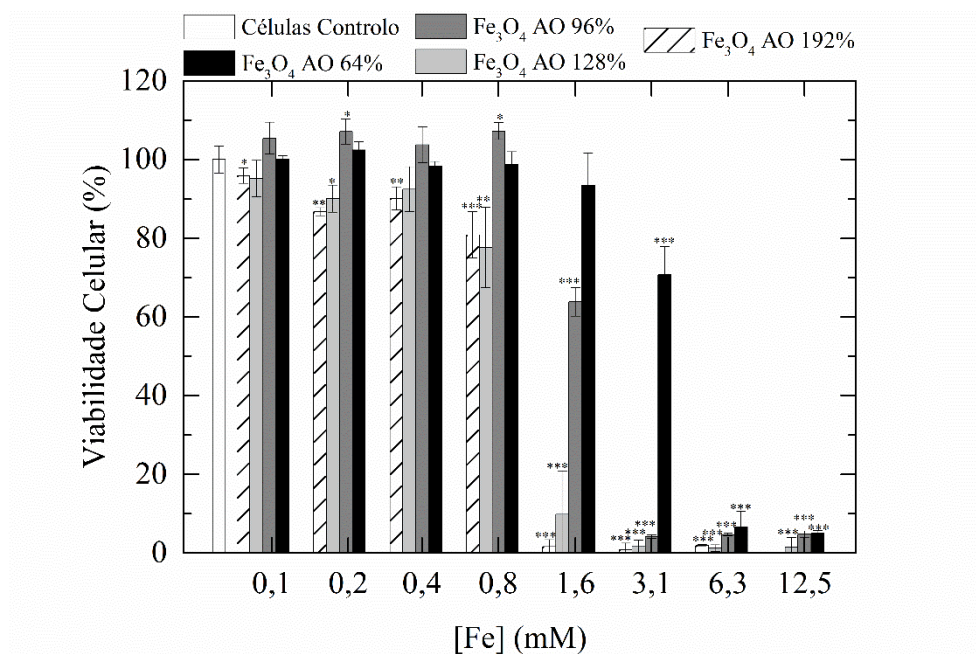


Fig. 4-11 Viabilidade celular de células Vero após 24 h de exposição aos quatro tipos de nanopartículas: NPs Fe₃O₄ AO 64%, NPs Fe₃O₄ AO 96%, NPs Fe₃O₄ AO 128%, NPs Fe₃O₄ AO 192%. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão para, pelo menos, três experiências independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ comparativamente às células controlo.

Pela análise da figura é possível verificar-se que as nanopartículas de Fe₃O₄ AO 64% não apresentam efeitos tóxicos até 1,6 mM. No entanto, quando a concentração de ferro aumenta para 3,1 mM, a viabilidade celular decresce em cerca de 20%, comparativamente à mesma a 1,6 mM, cujo valor é de 93%. Para as concentrações de 6,3 mM e 12,5 mM, a viabilidade celular cai abruptamente para valores que rondam os 7% e os 5%, respetivamente, causando, portanto, efeitos tóxicos severos.

O perfil das nanopartículas de Fe₃O₄ AO 96% é idêntico às revestidas com 64%, com a diferença de que os efeitos tóxicos associados às primeiras começam a fazer-se sentir mais cedo. De facto, enquanto para uma concentração de ferro de 1,6 mM, a viabilidade celular das nanopartículas de Fe₃O₄ AO 64% é de 93%, a das nanopartículas de Fe₃O₄ AO 96% é de 64%. Aumentando esta concentração, a toxicidade é notória, apresentando uma viabilidade celular que ronda os 4%.

O comportamento das nanopartículas de Fe₃O₄ AO 128% e 192% é semelhante entre si. Além disso, é ainda possível constatar-se que os efeitos tóxicos são notórios para concentrações de ferro menores, quando comparado com as nanopartículas de Fe₃O₄ AO 96% e, consequentemente, de

AO 64%. De facto, até concentrações de 0,8 mM, a viabilidade celular das nanopartículas não é inferior a 78% e 81%, respetivamente. Contudo, aumentando a concentração de ferro, a mesma decai cerca de 70% para as nanopartículas Fe_3O_4 AO 128% e 80% para as nanopartículas Fe_3O_4 AO 192%.

Dado o exposto, conclui-se que as Fe_3O_4 AO 64% são passíveis de serem usadas em aplicações biomédicas quando a concentração de ferro é menor ou igual a 3,1 mM (viabilidade celular de 70%). Para as Fe_3O_4 AO 96%, o intervalo diminui, já que apenas o são para concentrações menores ou iguais a 1,6 mM (viabilidade celular de 64%). A tendência de o aumento da concentração de ácido oleico que reveste as nanopartículas diminuir a concentração de ferro a partir da qual as mesmas podem ser utilizadas como biomateriais mantém-se quando se transita para as nanopartículas de Fe_3O_4 AO 128% e Fe_3O_4 AO 192%. De facto, para estas últimas, a concentração de ferro não pode ser superior a 0,8 mM, já que a partir deste valor a sua viabilidade celular é de apenas 9,8% e 1,6%, respetivamente.

Cruzando estes resultados com os obtidos no contraste das imagens apresentadas em 4.2.2, as nanopartículas que surgem como mais promissoras para agentes de contraste em imagem por ressonância magnética nuclear são as nanopartículas Fe_3O_4 AO 128%, uma vez que o contraste por elas gerado quando a concentração de ferro é de 0,8 mM (concentração na qual nenhuma das amostras apresenta efeitos tóxicos) é superior ao contraste gerado pelas restantes nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de ácido oleico.

Considerações finais

5.1. Conclusões

Recorde-se as principais motivações, finalidades e etapas do estudo empírico realizado.

A imagem por ressonância magnética tem-se revelado uma técnica de diagnóstico de excelência, uma vez que apresenta uma elevada resolução espacial. No entanto, exhibe baixa sensibilidade, o que nem sempre permite uma nítida diferenciação dos tecidos em análise. Tal facto pode ser compensado recorrendo-se a agentes de contraste que diminuem o tempo de relaxação da água e, consequentemente, melhoram o contraste da imagem. De entre os mais recentemente investigados e atendendo às suas propriedades, merecem lugar de destaque as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas. Não obstante, por tenderem a agregar em solução aquosa e poderem diminuir a viabilidade celular, comprometem a sua aplicação em condições fisiológicas, impedimento que tensioativos biocompatíveis podem minimizar.

Neste contexto, o principal objetivo que o presente trabalho perseguiu foi estudar o efeito de diferentes concentrações de ácido oleico (AO) no revestimento de nanopartículas de óxido de ferro nos tempos de relaxação da água, bem como aferir o seu efeito no contraste em IRM.

As nanopartículas estudadas no âmbito do presente estudo foram sintetizadas por precipitação química, tendo sido realizadas duas sínteses a 25°C e duas a 80°C. As nanopartículas produzidas a 25°C foram revestidas com ácido oleico e dioctil sulfosuccinato de colina, e as sintetizadas a 80°C foram revestidas apenas com ácido oleico. Todas as suspensões de nanopartículas sintetizadas foram avaliadas por DLS, de forma a se averiguar o seu tamanho e dispersão. Utilizando este método, chegou-se à conclusão que as tentativas a 80°C, assim como o revestimento com o líquido iónico, originavam partículas com elevados índices de polidispersão e a formação de agregados com dimensões micrométricas, razão pela qual não se prosseguiu com o estudo em ambos os casos. Em função dos resultados obtidos, o estudo prosseguiu somente com as nanopartículas sintetizadas a 25°C e revestidas com ácido oleico.

Estas foram, então, caracterizadas por FTIR, TGA, DRX, TEM, relaxometria por RMN e citotoxicidade. Ainda se analisou o seu efeito em IRM. Para além disto, foi medido o potencial zeta das nanopartículas Fe₃O₄ AO 64%.

Como principais conclusões da investigação realizada, destaque-se, no que concerne a DLS e às sínteses a 25°C, que um aumento da concentração de ácido oleico resulta num aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas – 144 ± 2 nm, 155 ± 6 nm, 160 ± 24 nm e 171 ± 27 nm, para Fe₃O₄ AO 64%, 96%, 128% e 192%, respetivamente. Ainda assim, os índices de polidispersão obtidos foram inferiores a 0,2 para as quatro amostras, indicando tratar-se de soluções monodispersas.

No que diz respeito às soluções a 80°C, de entre as concentrações de ferro estudadas, apenas a menor se mostrou passível de ser analisada por DLS, uma vez que o índice de polidispersão das restantes foi superior a 0,7. Para esta, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi de 244 ± 4 nm e 161 ± 4 nm, respetivamente, quando o ácido oleico foi adicionado de imediato ou após o processo de lavagem. Estes resultados indiciam uma relação entre o diâmetro hidrodinâmico em função do pH sendo que, no presente estudo, um pH mais elevado resultou num aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. Comparando as correspondentes amostras dos dois blocos (Fe₃O₄ AO 64% e com lavagem), verifica-se que o aumento da temperatura corresponde a um aumento do diâmetro hidrodinâmico, bem como do índice de polidispersão.

No que diz respeito ao potencial zeta, constata-se que, para valores de pH entre 6,6 e 10,1, este potencial situa-se abaixo de -30 mV, o que mostra que as nanopartículas se encontram estáveis em solução. Ainda neste intervalo, observa-se uma invariância do diâmetro hidrodinâmico das mesmas, o qual ronda os 120 nm. Para valores de pH fora deste intervalo, verifica-se um aumento do diâmetro hidrodinâmico, assim como do potencial zeta para valores que indicam instabilidade das nanopartículas.

Com a análise por FTIR e TGA, prova-se a ligação do ácido oleico às nanopartículas, bem como a presença de uma bicamada para as quatro amostras - Fe₃O₄ AO 64%, 96%, 128% e 192%. Com a primeira técnica fica ainda demonstrado a presença de bandas de absorção típicas de óxido de ferro.

Os resultados de TEM revelam que o tamanho do diâmetro do núcleo das nanopartículas, o qual ronda os 10 nm, não é influenciado pela concentração do revestimento. Estes permitem, ainda, observar que uma maior concentração de ácido oleico se traduz numa menor agregação das nanopartículas.

O padrão de DRX reflete a presença de uma estrutura cristalina de magnetite em todas as nanopartículas. O tamanho do cristalito, calculado pela equação de *Scherrer*, foi de 11,9 nm, 9,5 nm, 10,7 nm e 11,1 nm para as nanopartículas Fe₃O₄ AO 64%, 96%, 128% e 192%, respetivamente. Tais valores situam-se no intervalo definido pelo desvio-padrão em relação à média dos tamanhos das nanopartículas obtidos por TEM.

Relativamente ao estudo da relaxometria por RMN, apesar de se terem mantido as concentrações de ferro para as quatro concentrações de ácido oleico em análise, a discussão dos resultados foi realizada atendendo às condições iniciais das suas sínteses, das quais emergiram duas situações – numa (A), manteve-se a concentração de ferro e alterou-se a concentração de ácido oleico e na outra (B) preservou-se a concentração de ácido oleico e variou-se a concentração de ferro. No que concerne à situação A, observa-se que uma maior concentração de ácido oleico resulta numa diminuição da relaxividade, tanto longitudinal como transversal. Em relação à situação B, constata-se que uma maior concentração inicial de nanopartículas para uma mesma concentração de ácido oleico redundava num maior estado de agregação e numa menor relaxividade, tanto longitudinal como transversal. O comportamento destas soluções veio evidenciar a importância das condições iniciais de síntese. As condições analisadas, embora se encontrem em circunstâncias semelhantes de concentração de NP e AO, apresentam um efeito de memória relativamente às condições em que cada solução foi preparada, sendo que a concentração relativa de NP/AO é crucial para a eficácia do agente de contraste.

Das quatro amostras estudadas, as nanopartículas Fe₃O₄ AO 128% apresentam maiores relaxividades, seguidas das Fe₃O₄ AO 64%, Fe₃O₄ AO 192% e, por fim, Fe₃O₄ AO 96%. Tendo o efeito das nanopartículas nos tempos de relaxação da água sido, maioritariamente, ao nível de T_2 , obteve-se um contraste negativo nas imagens adquiridas. À medida que a concentração de ferro aumenta, o contraste é maior, o que se torna mais nítido na imagem correspondente às das NPs Fe₃O₄ AO 96%. Para as restantes, a partir de uma concentração de ferro de 1,6 mM, apesar do contraste aumentar, este não é tão evidente.

Foram ainda realizados ensaios de citotoxicidade em fibroblastos para diferentes concentrações de ferro, mostrando que existe um compromisso com a quantidade de ácido oleico usada. A concentração a partir da qual nenhuma das amostras apresenta efeitos tóxicos significativos é igual ou inferior a 0,8 mM.

Assim, a investigação levada a cabo permite concluir que, entre as nanopartículas estudadas, as revestidas com 128% de ácido oleico surgem como as mais promissoras como AC para IMR.

5.2. Sugestão de investigação futura

Os resultados que se obtiveram apontam para as potencialidades das nanopartículas Fe_3O_4 AO 128% como agentes de contraste em IRM. Contudo, ainda é necessário muito trabalho até que se possa utilizar tais NPs para aplicação clínica.

No que concerne a este trabalho, em particular, poder-se-ia levar a cabo estudos mais aprofundados, quer em amplitude quer em profundidade. Em relação à síntese de NPs, e com base nos resultados obtidos, poder-se-ia otimizar o processo de síntese (temperatura, pH, concentração da solução inicial), por forma a diminuir a agregação das partículas e a otimizar o revestimento com ácido oleico. Por outro lado, a utilização do dioctil sulfosuccinato de colina como revestimento das NPs poderá ter potencial para originar agentes de contraste de IRM, desde que o processo de revestimento seja devidamente estudado.

Tendo em conta os resultados obtidos relativamente às relaxividades e à relação com as condições da suspensão de NPs inicial, seria importante variar as concentrações iniciais das nanopartículas para uma mesma concentração de ácido oleico e, por outro lado, alterar as concentrações de ácido oleico, mantendo as concentrações iniciais das nanopartículas e experimentando-as *in vivo*. Desta forma, poder-se-ia consolidar os resultados obtidos neste trabalho e estabelecer um modelo de relação entre as condições iniciais e os efeitos em IRM.

A sedimentação das nanopartículas após uma longa exposição a um campo magnético merece também uma mais aturada investigação para averiguar a sua implicação em contextos *in vivo*.

Espera-se que as investigações encetadas possam contribuir para potenciar o diagnóstico por IRM de diversas patologias, como o cancro.

Referências bibliográficas

1. Thomas, R., I.K. Park, and Y.Y. Jeong, *Magnetic iron oxide nanoparticles for multimodal imaging and therapy of cancer*. Int J Mol Sci, (2013). **14**(8): p. 15910-30.
2. Qiao, R.Y., C. and Gao, M., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications*†. Journal of Materials Chemistry, (2009). **19**: p. 6274–6293.
3. Lee, S.H., et al., *Paramagnetic inorganic nanoparticles as T1 MRI contrast agents*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, (2014). **6**(2): p. 196-209.
4. Stephen, Z.R., F.M. Kievit, and M. Zhang, *Magnetite nanoparticles for medical MR imaging*. Materials Today, (2011). **14**(7-8): p. 330-338.
5. Ma, X., et al., *Exploring a new SPION-based MRI contrast agent with excellent water-dispersibility, high specificity to cancer cells and strong MR imaging efficacy*. Colloids Surf B Biointerfaces, (2015). **126**: p. 44-9.
6. Soares, P.I.P., et al., *Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications*. Applied Surface Science, (2016). **383**: p. 240-247.
7. Velusamy, P., et al., *Synthesis of oleic acid coated iron oxide nanoparticles and its role in anti-biofilm activity against clinical isolates of bacterial pathogens*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, (2016). **59**: p. 450-456.
8. Haracz, S., et al., *Effect of surfactant for magnetic properties of iron oxide nanoparticles*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, (2015). **364**: p. 120-126.
9. Liu, X., et al., *Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, (2006). **306**(2): p. 248-253.
10. Mahdavi, M., et al., *Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Molecules, (2013). **18**(7): p. 7533-48.
11. Maity, D. and D.C. Agrawal, *Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, (2007). **308**(1): p. 46-55.
12. Huang, G., et al., *A novel strategy for surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging*. J Mater Chem, (2009). **19**: p. 6367-6372.
13. Smolensky, E.D., et al., *Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications - effect of anchoring group and ligand exchange protocol*. Contrast Media Mol Imaging, (2011). **6**(4): p. 189-99.

14. Khalkhali, M., et al., *The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study*. Daru, (2015). **23**: p. 45.
15. Patsula, V., et al., *Superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles: synthesis by thermal decomposition of iron(III) glucuronate and application in magnetic resonance imaging*. ACS Appl Mater Interfaces, (2016). **8**(11): p. 7238-47.
16. Carvalho, A., et al., *Enhanced contrast efficiency in MRI by PEGylated magnetoliposomes loaded with PEGylated SPION: effect of SPION coating and micro-environment*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, (2014). **43**: p. 521-6.
17. McRobbie, D., Moore, E., Graves, M. and Prince, M., *MRI From picture to proton* (2006), New York: Cambridge University Press.
18. Claridge, T., *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry*. Tetrahedron Organic Chemistry Series, ed. J.E.B.a.R.M.W. J.-E. Bačkvall (2009), Uk and The Netherlands: Elsevier.
19. Merbach, A., Helm, L., and Tóth, E., *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging* (2013), United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
20. Schild, H., *MRI Made Easy*. 1990, Berlin/Bergkamen: Schering AG.
21. Ronczka, M. and M. Müller-Petke, *Optimization of CPMG sequences to measure NMR transverse relaxation time T₂ in borehole applications*. Geoscientific Instrumentation, Methods and Data Systems, (2012). **1**(2): p. 197-208.
22. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L.V., and and R.N. Muller, *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications*. Chemical Reviews, (2008). **108**: p. 2064–2110.
23. Estelrich, J., M.J. Sanchez-Martin, and M.A. Busquets, *Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents*. Int J Nanomedicine, (2015). **10**: p. 1727-41.
24. Thorek, D.L., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging*. Ann Biomed Eng, (2006). **34**(1): p. 23-38.
25. Klasson, A., *MRI Contrast enhancement using Gd₂O₃ nanoparticles*, in *Department of Medicine and Health Sciences* (2008), Linköping University. p. 52.
26. Xie, S., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with different polymers and their MRI contrast effects in the mouse brains*. Applied Surface Science, (2015). **326**: p. 32-38.
27. Wu, W., et al., *Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications*. Science and Technology of Advanced Materials, (2016). **16**(2): p. 023501.
28. Sun, C., J.S. Lee, and M. Zhang, *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, (2008). **60**(11): p. 1252-65.
29. Knox, K., *Ferrimagnetism*. Journal of Chemical Education, (1989). **66**(4).
30. Hola, K., et al., *Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances*. Biotechnol Adv, (2015). **33**(6 Pt 2): p. 1162-76.
31. Huang, J., Bu, L., Xie, J., Chen, K., Cheng, Z., Li, X. & Chen, X., *Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles*. acsnano, (2010). **4**(12): p. 7151–7160.

32. Soares, P.I., et al., *Thermal and magnetic properties of iron oxide colloids: influence of surfactants*. Nanotechnology, (2015). **26**(42): p. 425704.
33. Yang, K., et al., *Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles*. Applied Surface Science, (2010). **256**(10): p. 3093-3097.
34. Bloemen, M., et al., *Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. J Nanopart Res, (2012). **14**(9): p. 1100.
35. Medeiros, S.F., et al., *Synthesis and characterization of stable aqueous dispersion of functionalized double-coated iron oxide nanoparticles*. Materials Letters, (2015). **160**: p. 522-525.
36. Lima, F., *Síntese e caracterização de nanoestruturas magnéticas como agente de contraste em imagens biomédicas*, in *Faculdade de Engenharia, Faculdade de Física, Faculdade de Química* (2012), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
37. Li, L., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking*. Theranostics, (2013). **3**(8): p. 595-615.
38. Mahmoudi, M., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy*. Adv Drug Deliv Rev, (2011). **63**(1-2): p. 24-46.
39. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, (2005). **26**(18): p. 3995-4021.
40. Alves, A.M., *Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄*, in *Faculdade de Ciências e Tecnologia* (2012), Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa.
41. Gnanaprakash, G., Philip, J., Jayakumar, T. and Raj, B., *Effect of digestion time and alkali addition rate on physical properties of magnetite nanoparticles*. Physical Chemistry, (2007). **111**: p. 7978-7986.
42. Talelli, M., Rijcken, C., Lammers, T., Seevinck, P., Storm, G., Nostrum, C., and Hennink, W., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery*. Langmuir, (2009). **25**: p. 2060-2067.
43. Soares, P., *Chitosan-based magnetic nanoparticles for osteosarcoma theranostic*, in *Faculdade de Ciências e Tecnologia* (2015), Universidade Nova de Lisboa: Lisboa.
44. Hall, J., Dobrovolskaia, M.A., Patri, A.K., McNeil, S.E., *Characterization of nanoparticles for therapeutics*. Nanomedicine, (2007). **2**(6): p. 789-803.
45. Lawaczeck, R.d., M. Menzel, and H. Pietsch, *Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging*. Applied Organometallic Chemistry, (2004). **18**(10): p. 506-513.
46. Worldwide, M.I., *Dynamic light scattering common terms defined*, (2011), Malvern Instruments Limited: UK.
47. nanoComposix, *Nanocomposix's guide to dynamic light scattering measurement and analysis*, (2015), nanoComposix: SAN DIEGO.
48. Lim, J., Yeap, S., Che, H., and Low, S., *Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering*. Nanoscale Research Letters, (2013). **8**(381): p. 1-14.

49. Cumberland, S.a.L., J., *Structure of iron oxide nanoparticles; influence of pH and natural organic macromolecules*, (2008), <https://www.researchgate.net/publication/274837720>.
50. Suga, K., et al., *Characterization of aqueous oleic acid/oleate dispersions by fluorescent probes and raman spectroscopy*. Langmuir, (2016). **32**(30): p. 7606-12.
51. Dupont, J. and J.D. Scholten, *On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids*. Chem Soc Rev, (2010). **39**(5): p. 1780-804.
52. He, Z.a.A., P., *Nanoparticles in ionic liquids: interactions and organization*. Physical Chemistry Chemical Physics, (2015). **17**: p. 18238--18261.
53. Vollmer, C. and C. Janiak, *Naked metal nanoparticles from metal carbonyls in ionic liquids: Easy synthesis and stabilization*. Coordination Chemistry Reviews, (2011). **255**(17-18): p. 2039-2057.
54. Zhang, S., et al., *Sonochemical formation of iron oxide nanoparticles in ionic liquids for magnetic liquid marble*. Phys Chem Chem Phys, (2012). **14**(15): p. 5132-8.
55. Clogston, J.D. and A.K. Patri, *Zeta potential measurement*. Methods Mol Biol, (2011). **697**: p. 63-70.
56. nanoComposix, *Zeta potential analysis of nanoparticles*, (2011), nanoComposix: San Diego.
57. Vijayakumar, S., *In vitro stability studies on gold nanoparticles with different stabilizing agents*. International Journal of Current Science, (2014). **11**: p. 84-93.
58. Janke, J.J., W.F. Bennett, and D.P. Tieleman, *Oleic acid phase behavior from molecular dynamics simulations*. Langmuir, (2014). **30**(35): p. 10661-7.
59. Harris, R.A., P.M. Shumbula, and H. van der Walt, *Analysis of the interaction of surfactants oleic acid and oleylamine with iron oxide nanoparticles through molecular mechanics modeling*. Langmuir, (2015). **31**(13): p. 3934-43.
60. Ripin, D.H.a.E., D.A., *pka's table*, Dep. Of Chemistry, UW Madison University.
61. Masur, S., et al., *Characterization of the oleic acid/iron oxide nanoparticle interface by magnetic resonance*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, (2016). **415**: p. 8-12.
62. Sahoo, S., Pizem, H., Fried, T., Golodnitsky, D., Burstein, L., Sukenik, C., and Markovich, G, *Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids*. Langmuir, (2001). **17**: p. 7907-7911.
63. Lan, Q., et al., *Synthesis of bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their application in pH-responsive Pickering emulsions*. Journal of Colloid and Interface Science, (2007). **310**(1): p. 260-269.
64. Patil, R.M., et al., *Non-aqueous to aqueous phase transfer of oleic acid coated iron oxide nanoparticles for hyperthermia application*. RSC Adv., (2014). **4**(9): p. 4515-4522.
65. Soleymani, M. and M. Edrissi, *Synthesis of bilayer surfactant-coated magnetic nanoparticles for application in magnetic fluid hyperthermia*. Journal of Dispersion Science and Technology, (2015). **37**(5): p. 693-698.
66. Roch, A., Moïny, F., Muller, R.N., Gillis, P., *Water magnetic relaxation in superparamagnetic colloid suspensions: the effect of agglomeration*, in *Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science*, J.F.a.O. Lapina, Editor (2002), Kluwer Academic Publishers. p. 383-392.

67. Caravan, P., et al., *Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents*. Contrast Media Mol Imaging, (2009). **4**(2): p. 89-100.
68. Martinez-Gonzalez, R., J. Estelrich, and M.A. Busquets, *Liposomes loaded with hydrophobic iron oxide nanoparticles: suitable T(2) contrast agents for MRI*. Int J Mol Sci, (2016). **17**(8).
69. Lin, Y., Wang, S., Zhang, Y., Gao, J., Hong, L., Wang, X., Wu, W. and Jiang, X., *Ultra-high relaxivity iron oxide nanoparticles confined in polymer nanospheres for tumor MR imaging*. Journal of Materials Chemistry B, (2015). **00**: p. 1-3.
70. Duan, H., Kuang, M., Wang, X., Wang, Y.A., Mao, H. and Nie, S., *Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals: new insights into spin disorder and proton relaxivity*. Physical Chemistry C, (2008). **112**: p. 8127–8131.
71. Chang, H., Tsung, T., Lin, C., Lin, H., Lin, C., Lo, C., and Su, H., *A Study of magnetic field effect on nanofluid stability of CuO*. Materials Transactions, (2004). **45**(4): p. 1375-1378.
72. Kendall, K. and M.R. Kosseva, *Nanoparticle aggregation influenced by magnetic fields*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, (2006). **286**(1-3): p. 112-116.
73. Bradford, P., *The aggregation of iron oxide nanoparticles in magnetic fields*, in *School of Chemical Engineering* (2010), University of Birmingham: UK.